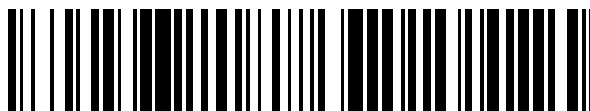


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 659**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

C07K 14/285 (2006.01)

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014** **PCT/EP2014/058396**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014** **WO14174043**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014** **E 14719739 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 2988779**

54 Título: **Bacterias mutantes para la producción de módulos generalizados para antígenos de membrana**

30 Prioridad:

24.04.2013 WO PCT/EP2013/058459

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ARICO, MARIA;
ERCOLI, GIUSEPPE;
NORAIS, NATHALIE;
SORIANI, MARCO y
TANI, CHIARA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 808 659 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

Bacterias mutantes para la producción de módulos generalizados para antígenos de membrana

La presente solicitud reclama el beneficio de la solicitud PCT PCT/EP2013/058459 (presentada el 24 de abril de 2013).

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de las vesículas de bacterias gramnegativas, particularmente para su uso en composiciones inmunogénicas, por ejemplo, vacunas.

Antecedentes de la técnica

10 Las bacterias gramnegativas pueden liberar espontáneamente vesículas de sus membranas externas durante el crecimiento debido a la presión de turgencia de la envoltura celular. La formación de tales vesículas puede facilitarse mediante la interrupción de determinados componentes bacterianos, por ejemplo, las referencias 1 y 2 interrumpieron el sistema Tol-Pal de *E. coli* para proporcionar cepas que liberan vesículas en el medio de cultivo durante el crecimiento. Las vesículas también pueden producirse por la interrupción de bacterias enteras. Los procedimientos conocidos de producción de vesículas incluyen procedimientos que usan tratamiento con detergente (por ejemplo, con desoxicolato) [3 y 4], procedimientos sin detergente [5] o sometimiento a ultrasonidos [6], etc.

Estas vesículas (que generalmente se llaman ampollas y vesículas de la membrana externa (VME, del inglés outer membrane vesicles)) son ricas en células inmunogénicas asociadas a la superficie celular, antígenos periplásmicos y secretados y se han usado como vacunas, por ejemplo contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* [7]. Son particularmente adecuados para este uso porque las vesículas contienen compuestos que actúan como adyuvantes, provocando fuertes respuestas inmunitarias contra los antígenos. De esta manera, las vesículas son un imitador más cercano de la bacteria nativa para el sistema inmunitario que las proteínas antigénicas purificadas u otros componentes bacterianos. Sin embargo, como las vesículas derivan de bacterias, por lo general, requieren tratamiento para eliminar los componentes bacterianos reactogénicos como la endotoxina. Esto puede lograrse mediante tratamiento con detergente. etc. [8].

25 Bemadac y col. 1998 y el documento WO 2013/006055 desvelan que la delección de tolA da como resultado una producción aumentada de vesículas de membrana externa.

Es un objeto de la invención proporcionar componentes adicionales y mejorados para preparar estas vesículas, y en particular vesículas que pueden usarse como vacunas. Un objeto específico de la invención es proporcionar una bacteria gramnegativa que esté adaptada para la producción de las vesículas. Por ejemplo, la bacteria puede adaptarse para proporcionar un alto rendimiento de vesículas, vesículas con contenido y/o composición proteica alterada y vesículas con eficacia protectora cruzada mejorada.

En particular en relación con *Haemophilus influenza*, sigue siendo necesario proporcionar una vacuna que proteja contra un amplio espectro de cepas de *Haemophilus influenzae*. *H. influenzae* es un microorganismo versátil con una capacidad mejorada para adaptarse a nuevos nichos y provocar un amplio espectro de enfermedades. Los factores de aptitud, virulencia y colonización pueden cambiar para permitir que el microorganismo se adapte a diferentes tejidos y hospedadores. Por lo tanto, los antígenos potenciales están sujetos a una alta presión selectiva y, como resultado, puede tener variabilidad de secuencia entre diferentes cepas.

Divulgación

40 Las bacterias gramnegativas están separadas del medio externo por dos capas sucesivas de estructuras de membrana. Estas estructuras, denominadas la membrana citoplasmática y la membrana externa (ME), difieren tanto estructural como funcionalmente. La membrana externa juega un papel importante en la interacción de las bacterias patógenas con sus respectivos hospedadores. En consecuencia, las moléculas bacterianas expuestas en la superficie representan dianas importantes para la respuesta inmunitaria del hospedador, haciendo que los componentes de la membrana externa sean candidatos atractivos para proporcionar vacuna, reactivos diagnósticos y terapéuticos.

La presente divulgación describe que la mutación o delección de uno o más genes que codifican polipéptidos que tienen en común el dominio catalítico LytM da como resultado un cambio drástico en la división celular bacteriana y el fenotipo bacteriano. Los inventores también han demostrado que dicha mutación o delección da como resultado la liberación de vesículas conocidas como VME o vesículas de membrana externa, mientras que las mismas cepas NTHi de tipo silvestre normalmente no liberan VME.

Los presentes inventores han generado bacterias gramnegativas en las que se altera la expresión normal de proteínas que contienen un dominio catalítico LytM (es decir, la proteína está inactivada) y han observado que estas bacterias tienen propiedades que pueden ser ventajosas en la preparación de vesículas. Estas propiedades incluyen una mayor tendencia a formar vesículas y cambios en la naturaleza y/o cantidad de proteínas presentes en las

vesículas resultantes. Se sabía en *E. coli* que dos componentes de la maquinaria de división con dominios LytM (EnvC y NlpD) son reguladores directos de las hidrolasas de la pared celular (amidases) responsables de la separación celular (AmiA, AmiB y AmiC) [9]. También se sabe que las metaloproteasas LytM en *E. coli* son absolutamente necesarias para la separación de células hijas.

- 5 En una realización particularmente preferida, se describe que al eliminar NT013 y/o NT022 no solo se ve afectada la división celular bacteriana, sino también hay una sorprendente producción y liberación de vesículas de membrana externa (VME) en cepas NTHI, que normalmente no liberan VME.

En particular, se ha mostrado en *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi) que la delección de NT013 provoca un aumento en la liberación de vesículas y cambios en el contenido de proteínas y/o composición de las vesículas resultantes, por ejemplo, en comparación con NHTi sin la delección, como se muestra con más detalle a continuación.

- 10 La delección de NT017 en NTHi provoca cambios en el contenido de proteína y/o composición de las vesículas resultantes, por ejemplo, en comparación con NHTi sin la delección, como se muestra con más detalle a continuación.

La delección de NT022 en NTHi provoca un aumento en la liberación de vesículas y cambios en el contenido de proteínas y/o composición de las vesículas resultantes, por ejemplo, en comparación con NHTi sin la delección, como se muestra con más detalle a continuación.

- 15 La tasa de crecimiento de la bacteria mutada puede ser comparable a la tasa de crecimiento del tipo silvestre, a diferencia de la tasa de crecimiento del mutante TolR conocido.

La presente invención por lo tanto proporciona un procedimiento para preparar vesículas a partir de una bacteria gramnegativa en la que al menos una proteína que contiene un dominio catalítico LytM se inactiva comprendiendo una etapa de obtención de vesículas a partir de un cultivo de la bacteria, en la que:

- 20 (a) la al menos una proteína que contiene un dominio catalítico de LytM se inactiva por una mutación de inactivación génica en la región codificante del gen o su promotor que:

(i) reduce el nivel de ARNm que codifica la proteína al 0 % de aquel producido por la bacteria de tipo silvestre;

- 25 o
(ii) inhibe la traducción del ARNm que codifica la proteína al 0 % de aquel producido por la bacteria de tipo silvestre.

Alternativa o adicionalmente, la al menos una proteína que contiene un dominio catalítico LytM se selecciona de una cualquiera de NT013, NT022 y NT017 de NTHi, en la que:

- 30 NT013 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o comparte una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO: 1,
NT022 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 o comparte una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO: 5 y
NT017 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o comparte una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO: 3.

- 35 Alternativa o adicionalmente, la bacteria Gram-negativa se selecciona de *H. influenzae* no tipificable, *N. meningitidis* y *B. pertussis*.

Alternativa o adicionalmente, las vesículas no comprenden ninguna bacteria viva y/o entera.

Alternativa o adicionalmente, el procedimiento comprende la etapa adicional de mezclar vesículas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 40 La divulgación por lo tanto proporciona bacterias gramnegativas en las que al menos una proteína que contiene el dominio catalítico LytM está inactivada, y procedimientos para preparar vesículas a partir de la bacteria. La divulgación también proporciona las vesículas obtenidas u obtenibles de esta bacteria y composiciones inmunogénicas que comprenden estas vesículas. Las composiciones inmunogénicas pueden usarse en particular como vacunas.

- 45 Por lo tanto la divulgación proporciona una bacteria gramnegativa en la que al menos un dominio catalítico de LytM que contiene proteína está inactivado. En una realización esto da como resultado una bacteria que, durante el crecimiento en medio de cultivo, libera mayores cantidades de vesículas en el medio y/o vesículas que tienen una composición de proteína diferente a la misma bacteria en la que la proteína que contiene un dominio catalítico LytM está activo. Opcionalmente la al menos una proteína que contiene un dominio catalítico de LytM no se expresa.

- 50 La divulgación también proporciona una bacteria gramnegativa en la que una o más proteínas que contienen el dominio catalítico de LytM tienen una modificación tal que, durante el crecimiento en medio de cultivo, la bacteria libera mayores cantidades de vesículas en el medio que la misma bacteria que carece de la modificación y/o vesículas que tienen un contenido y/o composición de proteína diferente a la misma bacteria que carece de la

modificación.

En particular, la presente divulgación, también proporciona una bacteria *NTHi* en la que uno o más de los antígenos de la divulgación (por ejemplo, NT013, NT017 y NT022) se ha/se han inactivado génicamente [10]. Las técnicas para producir bacterias de inactivación génica son bien conocidas y se ha informado la inactivación de genes de cepas *NTHi*, es decir, en la Ref. 11.

La divulgación también proporciona una bacteria *NTHi* en la que uno o más de los antígenos de la divulgación (por ejemplo, NT013, NT017 y NT022) tiene una mutación que inhibe su actividad. El gen que codifica el antígeno tendrá una mutación que cambia la secuencia de aminoácidos codificada o anula su expresión. La mutación puede implicar delección, sustitución y/o inserción, cualquiera de las cuales puede implicar uno o más aminoácidos.

Una realización proporciona delecciones de uno o más genes que codifican antígenos de la divulgación (por ejemplo, NT013, NT017 y NT022).

En una realización, la presente divulgación proporciona genes *NTHi* que codifican polipéptidos que tienen el dominio catalítico LytM. Generalmente las metaloproteasas se identifican en que contienen dominios de aminoácidos HxH y HxxxD en sus dominios catalíticos. Preferentemente, estos uno o más genes codifican uno cualquiera de NT013, NT022 o NT017.

Las realizaciones preferidas proporcionan cepas de *NTHi* en las que las delecciones de uno o más genes codifican una cualquiera de NT013 o NT022 o NT017. Por ejemplo, los genes eliminados pueden sustituirse con un casete de resistencia a antibióticos, tal como el casete de resistencia a la eritromicina. Se ha descubierto que todos los polipéptidos mencionados anteriormente tienen en común un dominio catalítico de LytM y son todos metaloproteasas.

También se ha descubierto que el dominio LytM en NT013 y NT022 está conservado. El sitio catalítico activo NT013 está representado por los siguientes motivos de aminoácidos -HKGD- y -HLH- en la porción C-terminal del sitio activo catalítico NT022 está representado por los siguientes motivos de aminoácidos -NKGID- y -KLH- en el C-terminal.

La divulgación también proporciona un procedimiento para preparar una bacteria gramnegativa, que comprende una etapa de modificación del gen o genes que codifican una o más proteínas que contienen el dominio catalítico de LytM de tal manera que la modificación provoque que la bacteria, cuando se cultiva en medio de cultivo, libere mayores cantidades de vesículas en el medio que la bacteria inicial y/o vesículas que tienen un contenido y/o composición de proteína diferente a la bacteria inicial. La etapa de mutación puede inactivar (por ejemplo, mutar o eliminar) el gen.

Las bacterias mutantes de la descripción son particularmente útiles para preparar vesículas de membrana externa bacterianas que incluyen antígenos *NTHi* (por ejemplo, antígenos de la divulgación (por ejemplo, NT013, NT017 y NT022)) y que pueden usarse como inmunógenos.

También se proporciona un procedimiento para producir una bacteria *NTHi* que sobreproduce VME de la divulgación, cuyo procedimiento comprende modificar genéticamente una cepa bacteriana gramnegativa mediante uno o más de los siguientes procedimientos: (a) diseñar por ingeniería genética la cepa para regular negativamente la expresión de uno o más genes *Tol*; y (b) mutar uno o más gen o genes que codifican una proteína que comprende un sitio asociado a peptidoglucano para atenuar la actividad de unión a peptidoglucano de la proteína o proteínas; (c) por mutación o delección de uno o más genes que codifican polipéptidos que tienen en común el dominio catalítico LytM. En una realización particularmente preferida, el *NTHi* podría no expresar genes NT013, NT022 y/o cualquiera de los genes *Tol* activos [11], [10]. En una realización, la modificación es mutación o delección de uno o más genes que codifican polipéptidos que tienen en común el dominio catalítico LytM.

La divulgación también proporciona una vesícula aislada u obtenible de una bacteria de la divulgación, por ejemplo, usando cualquiera de los procedimientos mencionados en el presente documento. Estas vesículas son útiles como componentes de vacunas.

La divulgación también proporciona un procedimiento para preparar una bacteria gramnegativa, por ejemplo, una vesícula de *NTHi*, que comprende una etapa de tratar una bacteria gramnegativa, por ejemplo, *NTHi* de la divulgación de tal manera que su membrana externa forme vesículas.

La divulgación también proporciona un procedimiento para preparar una bacteria gramnegativa, por ejemplo, una vesícula de *NTHi*, que comprende una etapa de cultivar una bacteria gramnegativa, por ejemplo, *NTHi* de la divulgación en condiciones en las que su membrana externa arroja vesículas espontáneamente.

La divulgación también proporciona un procedimiento para preparar vesículas, que comprende una etapa de separación de las vesículas de un medio de cultivo que comprende bacterias de la divulgación que se han cultivado en condiciones que permiten la liberación de vesículas en el medio por la bacteria. Las vesículas preparadas por este procedimiento pueden usarse como componentes de composiciones farmacéuticas que incluyen vacunas.

La divulgación también proporciona un medio de cultivo que comprende bacterias de la divulgación que se han cultivado en condiciones que permiten la liberación de vesículas en el medio por la bacteria. Las vesículas pueden purificarse a partir de este medio de cultivo.

- 5 La divulgación también proporciona una composición que comprende vesículas que, durante el cultivo de bacterias de la divulgación, se liberan en el medio de cultivo. Esta composición no comprende ninguna bacteria viva y/o entera. Esta composición y/o sus componentes pueden usarse para la preparación de vacunas.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden vesículas de la divulgación pueden usarse en medicina, por ejemplo, en procedimientos de tratamiento o prevención de infecciones y en procedimientos para generar una respuesta de anticuerpos.

- 10 La divulgación también proporciona una composición que comprende vesículas, en la que las vesículas están presentes en el filtrado obtenible después de la filtración a través de un filtro de 0,22 µm de un medio de cultivo en el que se ha cultivado una bacteria de la divulgación. Esta composición y/o sus componentes pueden usarse para la preparación de vacunas.

Proteínas que contienen el dominio LytM

- 15 De acuerdo con la divulgación, una o más proteínas que contienen el dominio LytM se modifican en una bacteria gramnegativa. Típicamente esto es inactivación (por ejemplo, por mutación o delección). Esto puede hacer que la bacteria se libere durante el crecimiento en el medio de cultivo (i) mayores cantidades de vesículas y/o (ii) vesículas que tienen un contenido y/o composición de proteínas diferente, que la misma bacteria en la que el dominio catalítico LytM que contiene proteína está activo. Pueden hacerse diversas modificaciones.

- 20 Las metaloproteasas del tipo lisostafina (LytM) de las peptidasas están ampliamente distribuidas, produciéndose en bacteriófagos, en bacterias grampositivas y gramnegativas. Las metaloproteasas que contienen el dominio catalítico LytM pertenecen a la familia de la peptidasa M23 [12], este dominio se identificó por primera vez en una autolisina secretada de *Staphylococcus aureus* [13].

- 25 Los dominios LytM y, por lo tanto, la proteína que contiene el dominio LytM pueden identificarse en general basado en la identidad de secuencia con los dominios LytM de proteínas conocidas que contienen el dominio LytM tales como EnvC, NlpD y YebA de *E. coli*, NT013, NT017 o NT022 de *Haemophilus influenza* no encapsulado (no tipificable).

- 30 Un dominio LytM de esta manera tiene típicamente al menos el 30, el 40, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de cualquiera de los LytM dominios a los que se hace referencia en el presente documento. Una proteína que contiene un dominio LytM contiene un dominio LytM. Se proporcionan ejemplos de secuencias para dominios LytM y proteínas que contienen dominios LytM a continuación.

Proteína que contiene el dominio catalítico LytM	Secuencia y SEQ ID NO para la proteína	Secuencia y SEQ ID NO para el dominio catalítico LytM
<i>H. influenzae</i> NT013 (anotado como NTH0532 en el genoma 86-028NP)	MPVQHVKLARDRRKKRTYIKVGFFVAAILLILTGIL LTIKDKSEENPIFSTSDSEYHELNTPNKNSTALQ PDEATSYDDELQAKDDEVKLSDDLGLTPQHA QDALNGLDAADQAIRITDQFSYTVTEGDTLKDVIV LSGLDDSSVQPLIKLDPDLAHLKAGQQFYWILNKND NLEYLNWLVSKEERIYERLEDGKFKRQVIEKKSIW RKEVLKGEIQNSLNSSLREQGLDTRQISQLSNALQW QVSLRKLKKGTFAILVSREYLGDKLTGQGNVEALR ISSGGKNYYAVQAAANGRYYNQQGETLGKGFARYPLQ RQARVSSPFNPNNRRHPVTGRVPR HKGVD FSVSQGTP VIAPADGTVEKVAYQAGGAGRYVMLRHGREYQTVYM HLSKSLVKAGQTVKKGERIALSGNTGISTG PHLH YE FRINGRAVNPLTVKLPGTSSGMTSAERKQFLVRVRE AEKMLKP (SEQ ID NO:1)	R PHKGVD FSVSQGTPVIAPADG TVEKVAYQAGGAGRYVMLRHGR EYQTVYMHLSKSLVKAGQTVKK GERIALSGNTGISTG PHLH YEF RINGRAVNP (SEQ ID NO:2)
<i>H. influenzae</i> NT017 (anotado como NTH0915 en el genoma 86-028NP) y	MLRFGVNVQKTSLLLTALLSCGLLIFSPVSQSSDLNQ IQKQIKQCESKIEKQKREQAKLQANLKKHESKINTV EGELLETEISLKEIRKQIADADKQFKQLEKQEREQK ARLAKQMDIIYRSGINPSLIERMFAQDPTKAERMKV YYQHINQVRIEMIDNLKATQAIQVQKEAILAQQKN HRNQLSTQKKQQQALQKQEQEHQSTLNLNKNLALD QDKLNALKANEQALRQEIQRAEQAAEQEKREREAL AQRQKAEKRTSKPYQPTVQERQLINSTSGLGAACK QYSLPVSGSILHTFGSIQAGEVRR WKGMV IGASAGTP VKAIAGRVILAGYLNQGYMVIQKHGETDLSLYGF NQAVSVKQGLVSAGQVIAQVGNTEISRS ALY FGI SRKGTVPNPGWVR (SEQ ID NO:3)	VR WKGMV IGASAGTPVKAIAAG RVILAGYLNQGYMVIQKHGET DLSLYGFNQAVSVKQGLVSAG QVIAQVGNTEISRS ALY FGIS RKGTVPNP (SEQ ID NO:4)

(continuación)

Proteína que contiene el dominio catalítico LytM	Secuencia y SEQ ID NO para la proteína	Secuencia y SEQ ID NO para el dominio catalítico LytM
<i>H. influenzae</i> NT022 (anotado como NTH0830 en el genoma 86-028NP)	MKKSFLLLPLSLVVLLSACTSNFPAPISDADGNLSPS VIQSVNGSNVGGAWQPEIQKNSLPTTGNMVTQPQNF QPINQQPTMTAPQAPAFQSPKTVVSAPTQTKTV TKTVADCVDGQHINI PRNPNTNVPDYSKI SKGSYKG NTYKVNKGDTMFLIAYLAGIDVKELAANNLSEPIN LSLGQVLKISNCSTKTVTTTVSVKQPAVTTSTATPV KPAVYTPGANGTIGSDGTIIGPIKSEAGTSPSVP VATSSQTVTSSVNNANSTPINSNVVAPIASHVVWQW PTSGNIIQGFSTDGCNGKIDISGSRGQAVKAAAAG RIVYAGNALRGYGNLII IKHNDDFLSAYAHNDKILV ADQQEVKAGQDIAKMGSSGTNTVKLHFEIRYKGSV DPVRYLPRH (SEQ ID NO:5)	GGNGKIDISGSRGQAVKAAAAG RIVYAGNALRGYGNLII IKHND DFLSAYAHNDKILVADQQEVKA GQDIAKMGSSGTNTVKLHFEIR YKGSVDP (SEQ ID NO:6)
<i>E. coli</i> YebA	MQQIARSVALAFNNLPRPHRVMLGSLTVLTLAVAVWRPYV YHRDATPIVKTIELEQNEIRSLLPEASEPIDQAAQEDEAI PQDELDDKIAGEAGVHEYVVSTGDTLSSILNQYGIDMGDI TQLAAADKELRNLKIGQQLSWTLTADGELQRLTWEVSRRE TRTYDRTAANGFKMTSEMQQGEWVNNLLKGTVGGSFVSA RNAGLTSAEVSAVIKAMQWQMDFRKLKKGDEFAVLMSREM LDGKREQSQLLGVRLRSEGKDYAIRAEDGKFYDRNGTGL AKGFLRFPTAKQFRISSNFNPRRTNPVTGRVAPHRGVDFA MPQGTPVLSVGDGEVVVAKRSGAAGYVVAIRHGRSYTTRY MHLRKILVKPGQKVKRGDRIALSGNTGRSTGPHLHYEVWI NQQAVNPLTAKLPRTEGLTGSDRRREFLAQAKEIVPQLRFD (SEQ ID NO:7)	PHRGVDFAMPQGTPVLSVGDGEVV VAKRSGAAGYVVAIRHGRSYTTRY MHLRKILVKPGQKVKRGDRIALSG NTGRSTGPHLHYEVWINQQAVNP (SEQ ID NO:8)

(continuación)

Proteína que contiene el dominio catalítico LytM	Secuencia y SEQ ID NO para la proteína	Secuencia y SEQ ID NO para el dominio catalítico LytM
<i>H. influenzae</i> NT022 (anotado como NTH0830 en el genoma 86-028NP)	MKKSFLLLPLSLVLSACTSNFPAPISDADGNLSPS VIQSVNGSNVGGAWQPEIQKNSLPTTGNMVTQPNE QPINQQPTMPTAPAQPAFQPSPKTVVSAPTQTKTV TKTVADCVDGQHINI PRNPNTNVPDYSKISKGSYKG NTYKVNKGDTMFLIAYLAGIDVKELAALNNLSEPYN LSLGQVLKISNCSTKTVTTVSVKQPAVTTSTATPV KPAVTYTPGANGTQIGSDGTIIIGPIKSEAGTSPSVP VATSSTQVTSNVNNANSTPINSNVVAPIASHVVWQW PTSGNIIQGFSSSTDGGNKGIDISGSRGQAVKAAAG RIVYAGNALRGYGNLII IKHNDDEFLSAYAHNDKILV ADQQEVKAGQDIAKMGSSGTNTVKLHFEIRYKGSV DPVRYLPRH (SEQ ID NO:5)	GGNKGIDISGSRGQAVKAAAG RIVYAGNALRGYGNLII IKHND DFLSAYAHNDKILVADQQEVKA GQDIAKMGSSGTNTVKLHFEIR YKGSVDP (SEQ ID NO:6)
<i>E. coli</i> YebA	MQQIARSVAFNNLPRPHRVMLGSLTVLT LAVAVWRPVV YHRDATPIVKTIELEQNEIRSLPEASEPIDQAAQDEAI PQDELDDKIAGEAGVHEVYVSTGDTLSSILNQYGIDMGDI TQLAAADKELRNKIGQQLSWTLTADGELQRLTWEVSRRE TRTYDRTAANGFKMTSEMQQGEWVNNLLKGTGGSFVASA RNAGLTSAEVS AVIKAMQWQMDFRKLKKGDEFVILMSREM LDGKREQSQLLVRLRSEGKDYIALRAEDGKFYDRNGTGL AKGFLRFPTAKQFRISNFNPRRTNPTGRVAPHRGVDFA MPQGTPLSVGDGEVVAKRSGAAGYVVAIRHGRSYTTRY MHLRKILVKPGQVKRGDRIALSGNTGRSTGPHLHYEVWI NQQAVNPLTAKLPRTEGLTGSDRRREFLAQAKEIVPQLRFD (SEQ ID NO:7)	HRGVDFAMPQGTPLSVGDGEVW VAKRSGAAGYVVAIRHGRSYTTRY MHLRKILVKPGQVKRGDRIALSG NTGRSTGPHLHYEVWINQQA VNP (SEQ ID NO:8)

El antígeno NT013 se anota como proteína que contiene repetición de TPR y también como subunidad de hemolisina de maduración de citocromo c CcmH2. Se ha lanzado como NTHI0532 en la cepa 86-028NP. NT013 se ha anotado como perteneciente a la familia de proteínas metaloproteasas y tiene un dominio catalítico LytM.

- 5 El antígeno NT013 tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal nativa 42 (aminoácidos 1 a 42 de la SEQ ID NO: 1). El antígeno NT013 sin la secuencia de aminoácidos N-terminal nativa 42 está representado por la SEQ ID NO: 85.

El antígeno NT017 se ha anotado como proteína de supervivencia proteína similar a SurA NTHI0915 en la cepa 86-026NP.

- 10 El antígeno NT017 tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal nativa 20 (aminoácidos 1 a 20 de la SEQ ID NO: 3). El antígeno NT017 sin la secuencia de aminoácidos N-terminal nativa 42 está representado por la SEQ ID NO: 86.

El antígeno NT022 se ha anotado como NTHI0830 de la cepa NP86-028 y se ha identificado que es una posible lipoproteína B antigénica de la membrana externa. Se ha clonado y expresado a partir de la cepa Fi176. También se ha descubierto que contiene un dominio catalítico de LytM y que está expuesto y secretado en la superficie.

- 15 El antígeno NT022 tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal nativa 18 (aminoácidos 1 a 18 de la SEQ ID NO: 5). El antígeno NT022 sin la secuencia de aminoácidos N-terminal nativa 18 está representado por la SEQ ID NO: 87.

Los homólogos de las proteínas que contienen el dominio LytM se encuentran en diversas bacterias gramnegativas y los ejemplos se exponen en la tabla a continuación:

	NT013	NT017	NT022
<i>Bordetella pertussis</i>	BP2956	BP0608	BP1721
<i>Campylobacter jejuni</i>	BN867_12080		
<i>Escherichia coli</i>	YebA	EnvC	NlpD
<i>Helicobacter pylori</i>	HP0506		
<i>Hemophilus influenzae</i>	NTHI0532	NTHI0915	NTHI0830
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CDK77985	CDK80041	CDK79716
<i>Legionella pneumophila</i>	lpp0627	lpp0562	NlpD
<i>Neisseria meningitidis</i>	NMB0315	NMB1333	NMB1483
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NGO1686	NGO0571	NGO1056
<i>Proteus mirabilis</i>	PMI1153	PMI3180	NlpD
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA0667	PA5133	PA3623
<i>Salmonella typhi</i>	STY2098	STY4090	NlpD
<i>Serratia marcescens</i>	YebA	SMWW4_v1c47520	NlpD
<i>Shigella flexneri</i>	YebA	YibP	NlpD
<i>Vibrio cholerae</i>	EET91248	EMP89515	NlpD
<i>Yersinia pestis</i>	YPZ3_1762	nlpD1	NlpD

- 20 Los dominios LytM pueden contener el motivo HxxxD (SEQ ID NO: 13) y/o HxH, por ejemplo, HKGVD (SEQ ID NO: 14), HRGVD (SEQ ID NO: 15), HTGID (SEQ ID NO: 16), HLH. Otros motivos específicos incluyen NKGVD (SEQ ID NO: 17), TKGID (SEQ ID NO: 18), NKGID (SEQ ID NO: 19), QLH, RLH, KLH, WKGVF (SEQ ID NO: 20), WRGLV (SEQ ID NO: 21), WKGMV (SEQ ID NO: 22), GLY, SLY, ALY.

- 25 Los antígenos NTHi, es decir, las proteínas, se definen anteriormente por referencia a convenciones de nomenclatura de las referencias, por ejemplo, la numeración "NTHI" (del genoma de la cepa 86-028NP). Tales convenciones se explican con más detalle en la referencia 14 (particularmente la Tabla 1). Por lo tanto puede encontrarse fácilmente una secuencia de aminoácidos y nucleótidos ejemplar para cualquiera de los antígenos, es decir, proteínas a las que se hace referencia en el presente documento, en bases de datos de secuencias públicas para las cepas indicadas (junto con información adicional, tal como anotaciones funcionales), pero la divulgación no se limita a secuencias de la cepa 86-028NP. Las secuencias del genoma de varias otras cepas de NTHI están
- 30

disponibles (nuevamente, véase la Tabla 1 de la referencia 14). Las técnicas de búsqueda y alineación convencionales pueden usarse para identificar en cualquiera de estas (u otras) secuencias genómicas adicionales el homólogo de cualquier secuencia particular dada en el presente documento. Además, las secuencias disponibles pueden usarse para diseñar cebadores para la amplificación de secuencias homólogas de otras especies y cepas. Por lo tanto la divulgación no se limita a estas especies y cepas específicas o las cepas en las que se encuentran las secuencias ejemplificadas, sino que abarca tales variantes y homólogos de otras gramnegativas, por ejemplo, cepas NTHI y el uso de especies y cepas en las que se encuentran tales variantes y homólogos, así como variantes no naturales. En general, las variantes adecuadas de una SEQ ID NO particular incluyen sus variantes alélicas, sus formas polimórficas, sus homólogos, sus ortólogos, sus parálogos, sus mutantes, *etc.* En realizaciones de la divulgación, una proteína que contiene un dominio LytM es un homólogo, ortólogo o parólogo de NT013, NT022 o NT017 de NTHi.

De esta manera, por ejemplo, los polipéptidos o proteínas usados con la divulgación, es decir, modificados en el transcurso de la divulgación pueden, en comparación con las SEQ ID NO en el presente documento, incluir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, *etc.*) sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas (es decir, sustituciones de un aminoácido por otro aminoácido que tenga una cadena lateral relacionada). Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos, es decir, aspartato, glutamato; (2) básicos, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polares, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptófano y tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene un efecto importante en la actividad biológica. Los polipéptidos, es decir, proteínas, también pueden incluir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, *etc.*) deleciones de aminoácidos individuales en relación con las secuencias SEQ ID NO. Los polipéptidos también pueden incluir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, *etc.*) inserciones (por ejemplo, cada una de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) en relación con las secuencias SEQ ID NO.

De forma similar, un polipéptido usado con la divulgación, es decir, modificado en el transcurso de la fabricación de la divulgación, puede comprender una secuencia de aminoácidos que:

(a) es idéntica (es decir, un 100 % idéntica) a una secuencia desvelada en el listado de secuencias;

(b) comparte identidad de secuencia (por ejemplo, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con una secuencia desvelada en el listado de secuencias;

(c) tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o más) alteraciones de aminoácidos individuales (deleciones, inserciones, sustituciones), que pueden estar en ubicaciones separadas o pueden ser contiguas, en comparación con las secuencias de (a) o (b); y/o

(d) cuando se alinea con una secuencia particular del listado de secuencias usando un algoritmo de alineamiento por pares, cada ventana en movimiento de x aminoácidos del extremo N al extremo C (de tal forma que para un alineamiento que se extiende hasta p aminoácidos, siendo $p > x$, hay $p-x+1$ ventanas de este tipo) tiene al menos x y aminoácidos idénticos alineados, en la que: x se selecciona de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y se selecciona de 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y si x y no es un número entero entonces se redondea al alza al número entero más próximo. El algoritmo de alineamiento por pares preferido es el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch [15], que usa parámetros por defecto (por ejemplo con una penalización por apertura de hueco = 10,0, y con una penalización por extensión de hueco = 0,5, usando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo se implementa convenientemente en la herramienta *needle* en el paquete EMBOSS [16].

Dentro del grupo (c), las deleciones o sustituciones pueden encontrarse en el extremo N y/o el extremo C o puede encontrarse entre los dos extremos. Por lo tanto un truncamiento es un ejemplo de una deleción. Los truncamientos pueden implicar la eliminación de hasta 40 (o más) aminoácidos en el extremo N y/o el extremo C. El truncamiento del extremo N puede retirar los péptidos líderes, por ejemplo, para facilitar la expresión recombinante en un hospedador heterólogo. El truncamiento del extremo C puede retirar las secuencias de anclaje, por ejemplo, para facilitar la expresión recombinante en un hospedador heterólogo.

En general, cuando un antígeno comprende una secuencia que no es idéntica a una secuencia del listado de secuencias tal como una secuencia NTHI (por ejemplo, cuando comprende una lista de secuencias con <100 % de identidad de secuencia a la misma, o cuando comprende un fragmento de la misma) se prefiere en cada caso individual de que el antígeno pueda provocar un anticuerpo que reconoce la secuencia NTHI respectiva del listado de secuencias.

En algunas realizaciones, la proteína que contiene LytM se selecciona de NT013 y NT022 de NTHi o un homólogo, ortólogo o parólogo de los mismos.

En algunas realizaciones, la proteína que contiene LytM es NT017 de NTHi o un homólogo, ortólogo o parólogo de los mismos.

La bacteria

La bacteria gramnegativa de la divulgación es típicamente una cepa de *Haemophilus influenzae* no encapsulada (no tipificable) (NTHi). Sin embargo, puede ser una bacteria gramnegativa diferente, incluyendo *Neisseria meningitidis* (especialmente el serogrupo B) y *B. pertussis*. En algunas realizaciones, la bacteria gramnegativa de la divulgación no es una cepa de *Haemophilus influenzae* no encapsulada (no tipificable).

Las especies ejemplares para su uso en la divulgación incluyen especies en cualquiera de los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Helicobacter*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, etc. En particular, la bacteria puede ser una especie de *Shigella* (tales como *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* o *S. sonnei*). Alternativamente, puede ser una especie de *Neisseria*, por ejemplo, una especie no patógena tales como *N. bacilliformis*, *N. cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. lactamica*, *N. macacae*, *N. mucosa*, *N. polysacchara*, *N. sicca* o *N. subflava* y en particular *N. lactamica*. Alternativamente, puede usarse una especie patógena de *Neisseria*, por ejemplo, *N. gonorrhoeae* o *N. meningitidis*. En otros ejemplos, la bacteria puede ser *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* (incluyendo las cepas no tipificables), *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica* (incluyendo las serovariedades *typhi* y *typhimurium*, así como las serovariedades *paratyphi* y *enteritidis*), *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* (por ejemplo *Proteus mirabilis*), *Citrobacter*, *Serratia* (por ejemplo *Serratia marcescens*), *Erwinia*, *Pasteurella*, *Yersinia pestis*, *E. coli* etc. También pueden usarse bacterias gramnegativas fotosintéticas. Normalmente, la bacteria es una cepa competente. Esta característica facilita la modificación genética de la bacteria.

Las bacterias gramnegativas pueden definirse en función de su forma, como cocos, bacilos o cocobacilos y la bacteria puede ser de esta manera un coco, bacilo o cocobacilo gramnegativo.

La bacteria gramnegativa es opcionalmente una proteobacteria, por ejemplo, perteneciente a una clase seleccionada de Alfaproteobacterias, Betaproteobacterias, Gammaproteobacterias, Deltaproteobacterias, Epsilonproteobacterias o Aciditio-bacilos. La bacteria gramnegativa opcionalmente no pertenece a una clase seleccionada de Alfaproteobacterias, Betaproteobacterias, Gammaproteobacterias, Deltaproteobacterias, Epsilonproteobacterias o Aciditibacilos.

En algunas realizaciones la bacteria coloniza a los humanos. En algunas realizaciones la bacteria es patógena en humanos.

En algunas realizaciones, la bacteria produce vesículas cuando se cultiva en condiciones normales de cultivo. En otras realizaciones, la bacteria no produce vesículas cuando se cultiva en condiciones normales de cultivo.

En algunas realizaciones la bacteria no es del género *Caulobacter*, por ejemplo no es *Caulobacter crescentus*. En algunas realizaciones la bacteria no es del género *Escherichia*, por ejemplo no es *E. coli*. En algunas realizaciones la bacteria no es del género *Helicobacter*, por ejemplo no es *H. pylori*. En algunas realizaciones la bacteria no es del género *Neisseria* por ejemplo no es *N. gonorrhoeae* o no es *N. meningitidis*. En algunas realizaciones la bacteria no es del género *Yersinia* por ejemplo no es *Yersinia pestis*. En algunas realizaciones la bacteria no es del género *Yersinia* por ejemplo no es *Yersinia pestis*. En algunas realizaciones la bacteria no es *H. somni*.

En algunas realizaciones la bacteria está en la clase Betaproteobacterias y la proteína que contiene LytM se selecciona de NT013, NT017 y NT022, opcionalmente seleccionado de NT017 y NT022 de NTNi, o un homólogo, ortólogo o parálogo de los mismos.

En algunas realizaciones la bacteria es un cocobacilo gramnegativo y la proteína que contiene LytM se selecciona de NT013, NT017 y NT022, opcionalmente seleccionado de NT013 y NT017 de NTNi, o un homólogo, ortólogo o parálogo de los mismos.

En algunas realizaciones la bacteria es un coco gramnegativo y la proteína que contiene LytM se selecciona de NT013, NT017 y NT022, opcionalmente seleccionado de NT017 y NT022 de NTNi, o un homólogo, ortólogo o parálogo de los mismos.

Cuando la bacteria es *Neisseria meningitidis* la proteína que contiene LytM puede seleccionarse, por ejemplo, de NMB1483, NMB0315 y NMB1333.

Cuando la bacteria es *B. pertussis* la proteína que contiene LytM puede seleccionarse, por ejemplo, de BP1721, BP2956, BP0608, BP2919, BP3015 y BP1017.

Otras mutaciones

Además de tener una proteína que contiene un dominio catalítico de LytM interrumpido, una bacteria gramnegativa de la divulgación puede incluir ventajosamente uno o más cambios adicionales con respecto a una cepa de tipo silvestre. Estos cambios pueden usarse, por ejemplo, para retirar componentes de la bacteria que serían tóxicos o

indeseables en una vacuna humana.

La bacteria también puede contener otras adaptaciones para la producción de vesículas. En particular, la bacteria típicamente comprende un genoma en el que una o más secuencias están presentes de manera que, en comparación con la misma bacteria sin dicha secuencia o secuencias, la bacteria produce mayores cantidades de vesículas. Las secuencias que aumentan la producción de vesículas pueden identificarse añadiendo o eliminando la secuencia a una cepa productora de vesículas y determinando el efecto sobre la producción de vesículas. Los ejemplos incluyen la inactivación o delección de cualquiera de los genes Tol [10,11].

Por ejemplo, puede haber modificaciones adicionales, por ejemplo, inactivaciones génicas en uno o más de *lpxL1*, *lgtB*, *porA*, *frpB*, *synX*, *lgtA*, *mltA* y/o *lst*.

En algunas realizaciones una bacteria puede incluir una o más de las mutaciones de inactivación y/o hiperexpresión desveladas en las referencias 17 y 18-20. Los genes adecuados para la modificación incluyen: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB [18]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB; y (d) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, Opa, OpC, PilC, PorB, SiaD, SynA, SynB y/o SynC.

Una bacteria puede tener una o más, o todas, de las siguientes características: (i) LgtB y/o GalE regulados negativamente para truncar el LOS; (ii) TbpA regulado positivamente; (iii) NhhA regulado positivamente; (iv) Omp85 regulado positivamente; (v) LbpA regulado positivamente; (vi) NspA regulado positivamente; (vii) PorA inactivado; (viii) FrpB regulado negativamente o inactivado; (ix) Opa regulado negativamente o inactivado; (x) Opc regulado negativamente o inactivado; (xii) complejo del gen cps eliminado. Un LOS truncado puede ser uno que no incluya un epítipo de sialil-lacto-N-neotetraosa, por ejemplo, podría ser un LOS deficiente en galactosa. El LOS puede no tener cadena α .

Dichas mutaciones se han descrito particularmente en *Neisseria meningitidis*.

Antígenos adicionales

Opcionalmente, la bacteria comprende un genoma en el que una o más secuencias están presentes de manera que, en comparación con la misma bacteria sin dichas secuencias, la bacteria produce vesículas que comprenden uno o más antígenos adicionales. Estos antígenos adicionales normalmente no se encuentran en la bacteria en su correspondiente cepa de tipo silvestre. Por ejemplo, el antígeno o antígenos adicionales pueden ser uno o más antígenos proteicos de una bacteria seleccionada de *Neisseria meningitidis* (especialmente el serogrupo B), *E. coli* patógeno, *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*. Otras bacterias adecuadas incluyen *Bacillus anthracis*, *Shigella*, *Chlamydia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium ulcerans*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella* (por ejemplo *Salmonella typhimurium*), *Yersinia* (por ejemplo *Yersinia pestis*), *Rickettsia prowazekii*, *Neisseria*, *Clostridium botulinum* y *Helicobacter*. De forma similar, el antígeno o antígenos adicionales pueden ser uno o más antígenos proteicos víricos, tales como un antígeno de un virus de la familia Adenoviridae, Picornaviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papovaviridae, Rhabdoviridae o Togaviridae, por ejemplo, un antígeno del VIH o la gripe. El antígeno o antígenos adicionales pueden ser uno o más antígenos proteicos de cualquier patógeno. El antígeno o antígenos adicionales también pueden ser uno o más antígenos de células cancerosas, por ejemplo, una o más oncoproteínas. Por lo tanto, las vesículas de la bacteria pueden usarse como un sistema de administración para presentar los antígenos adicionales al sistema inmunitario. La una o más secuencia o secuencias presentes en el genoma son, por lo tanto, capaces de dirigir la expresión del antígeno o antígenos adicionales en las vesículas. La secuencia o secuencias pueden estar integradas en el cromosoma bacteriano o pueden estar presentes en elemento o elementos genómicos no integrados, por ejemplo, plásmido o plásmidos. Por ejemplo, es eficiente incluir la secuencia o secuencias dentro de uno o más vectores de expresión de tal manera que sea posible controlar la expresión en la bacteria. Por ejemplo, cada secuencia puede estar en un casete de expresión adecuado. Normalmente, las secuencias incluirán genes que codifican los antígenos adicionales, junto con cualquier secuencia reguladora requerida para la expresión eficaz en las vesículas (es decir, promotores, secuencias señal, chaperones, maquinaria de vía de secreción etc.). La persona experta conoce los procedimientos para dicha expresión génica heteróloga en bacterias gramnegativas, particularmente *E. coli*, y también cómo dirigir esta expresión para que las proteínas heterólogas estén presentes en las vesículas (véanse, por ejemplo, las ref. 21, 22, 23 etc.). Por ejemplo, las proteínas pueden fusionarse con los péptidos líderes apropiados para la compartimentación periplásmica. Cuando una proteína se dirige al periplasma de esta manera, puede ser útil romper las vesículas, por ejemplo, usando sometimiento a ultrasonidos y/o detergente, antes de la administración como una vacuna. Esto ayuda a liberar la proteína de la vesícula, mientras se conserva la adyuvancia de los otros componentes de la vesícula. De forma similar, las proteínas pueden fusionarse con secuencias líderes seguidas de una "caja de lipidación" para la compartimentación en la membrana interna y/o externa como lipoproteínas. Cuando una proteína se dirige a una membrana de esta manera, normalmente estará orientado dentro o fuera de la vesícula. Esta orientación puede cambiarse por la acción de mecanismos endógenos "flip/flop", por ejemplo, en especies de *Neisseria*. Las proteínas también pueden fusionarse con regiones transmembrana y/o

fusionarse con proteínas de membrana endógenas, por ejemplo, porinas, para la compartimentación de antígenos en la membrana externa. La eficiencia de expresión también puede optimizarse modificando el uso de codones en las secuencias para que coincida con las preferencias de la bacteria gramnegativa (ref. 24).

Preparación de mutantes

5 Las bacterias gramnegativas de la divulgación pueden prepararse convenientemente a partir de cepas de tipo silvestre u otras cepas iniciales usando técnicas convencionales de mutagénesis. La modificación (por ejemplo, la inactivación) de la proteína o gen que contiene el dominio LytM puede lograrse de varias maneras, por ejemplo, por
10 delección o mutación en su promotor, por delección o mutación de su codón de inicio, mediante la introducción de un codón de parada prematuro, por delección de la parte completa o parcial (por ejemplo, al menos el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 95 %) de la región codificante, por inactivación génica, etc. Se prefieren mutantes inactivados isogénicos. Una mutación de inactivación génica puede estar situada en la región codificante del gen o puede estar dentro de sus regiones de control transcripcional (por ejemplo, dentro de su promotor). Una mutación de inactivación génica reducirá el nivel de ARNm que codifica el antígeno al <1 % del producido por la bacteria de tipo silvestre, preferentemente <0,5 %, más preferentemente <0,1 % y lo más preferentemente al 0 %. En el ARNm de la
15 bacteria gramnegativa resultante que codifica el gen deseado está ausente y/o su traducción está inhibida (por ejemplo, típicamente a menos del 1 % de los niveles de tipo silvestre, preferentemente <0,5 %, más preferentemente <0,1 % y lo más preferentemente al 0 %).

Una bacteria gramnegativa de la divulgación puede contener un gen marcador en el o en lugar del gen inactivado, por ejemplo, un antibiótico, por ejemplo, marcador de resistencia a eritromicina. Esto puede lograrse usando
20 recombinación homóloga. También pueden usarse delecciones sin marcar (es decir, delección sin la introducción de un gen marcador).

En algunas realizaciones, al menos un dominio LytM que contiene proteína está inactivado, por ejemplo, de tal manera que no lleva a cabo su función normal, o lo hace a un nivel reducido. Esto puede surgir a través de la reducción en la cantidad de proteína que se expresa y/o por una reducción en la actividad de la proteína expresada.
25 Por lo tanto, puede haber inactivación (por ejemplo, por mutación o una delección) en el gen que codifica la proteína. En una realización, la proteína que contiene el dominio LytM se expresa a un nivel de menos del 90, el 80, el 70, el 60, el 50, el 40, el 30, el 20, el 10, el 5, el 2, el 1 % del nivel al que se expresa la proteína no modificada. La proteína que contiene el dominio LytM puede no expresarse. En una realización, la actividad de la proteína que contiene el dominio LytM expresado es menos del 90, el 80, el 70, el 60, el 50, el 40, el 30, el 20, el 10, el 5, el 2, el 1 % de la actividad de la proteína no modificada. La proteína que contiene el dominio LytM puede no ser funcional.
30

En algunas realizaciones, pueden hacerse mutaciones y/o delecciones en el dominio LytM. Pueden elegirse mutaciones y/o delecciones que hacen que el dominio LytM y/o la proteína que contiene el dominio LytM no sea funcional, o con una función reducida, como se define anteriormente.

Alternativamente, la delección o mutación puede reducir la actividad o función de la proteína que contiene el dominio LytM. La delección o mutación puede estar en el dominio LytM o en otra parte de la proteína. Por ejemplo la delección o mutación puede dar como resultado una proteína expresada que carece de uno o más de un dominio (por ejemplo, que carece del dominio LytM). El procedimiento de preparación de una cepa gramnegativa, por ejemplo, adecuado para la preparación de vesículas puede estar seguido de una etapa de cultivo de las bacterias modificadas obtenidas para proporcionar un cultivo bacteriano.
35

40 Las condiciones de cultivo para el crecimiento de bacterias gramnegativas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden cultivarse usando una fuente de nitrógeno orgánico (tales como mezclas de aminoácidos, por ejemplo, que contienen Ala, Arg, Asn, Asp; casaminoácidos, pueden usarse), glicerol como una fuente de carbono, etc. La inclusión de ácido L-aspartico en el medio es particularmente útil y puede funcionar tanto como fuente de nitrógeno como de carbono.

Procedimientos para producir las vesículas

La divulgación también proporciona procedimientos para preparar vesículas de la divulgación y vesículas obtenidas u obtenibles por estos procedimientos. El procedimiento comprende una etapa para obtener vesículas de un cultivo de bacterias. Las vesículas pueden obtenerse por ruptura o formación de ampollas de la membrana externa de la bacteria para formar vesículas a partir de ellas. Por lo tanto, el término "vesículas" típicamente significa VME, ampollas, microvesículas (MV [25]) y 'VME nativas' ('VMEN' [26]). Por lo general, también puede significar VME extraídas con detergente (VMED) y VME derivadas de mutantes (m-VME). La expresión "módulo generalizado para antígenos de membrana" puede usarse para vesículas obtenidas de bacterias mutantes.
50

De esta manera las vesículas pueden obtenerse cultivando una bacteria apropiada, por ejemplo, la bacteria de la divulgación en condiciones que permitan la liberación de vesículas, y un procedimiento de preparación de vesículas a partir de la bacteria de la divulgación puede comprender o comprender adicionalmente cultivar una bacteria apropiada, por ejemplo, la bacteria de la divulgación en condiciones que permitan la liberación de vesículas.
55

Las ampollas (incluyendo las VM) son vesículas de membrana de origen natural que se forman espontáneamente

durante el crecimiento bacteriano y se liberan al medio de cultivo. Preferentemente, las vesículas de la divulgación son ampollas porque la separación de ampollas liberadas espontáneamente del medio de cultivo es más conveniente que los procedimientos que implican la interrupción deliberada de la membrana externa (por ejemplo, por tratamiento con detergente o sometimiento a ultrasonidos). Además, están sustancialmente libres de membrana interna y contaminación citoplasmática. Estas vesículas típicamente tienen un diámetro de 35-120 nm o 20-100 nm por microscopía electrónica, por ejemplo, un diámetro de 50 nm y pueden purificarse del medio de cultivo. La purificación idealmente implica separar las vesículas de las bacterias vivas y/o intactas, por ejemplo, mediante filtración basada en el tamaño usando un filtro, tal como un filtro de 0,22 µm, que permite que las vesículas pasen a través pero no permite el paso de bacterias intactas, o mediante el uso de centrifugación a baja velocidad para sedimentar las células mientras se dejan las vesículas en suspensión. Un procedimiento preferido que implica un procedimiento de filtración de dos etapas se describe en la ref. 27.

Por lo tanto, a diferencia del medio de cultivo, las composiciones que contienen vesículas de la divulgación generalmente estarán sustancialmente libres de bacterias enteras, ya sea vivas o muertas. El tamaño de las vesículas significa que pueden separarse fácilmente de bacterias enteras por filtración, por ejemplo, como se usa típicamente para la esterilización por filtración. Aunque las vesículas pasarán por un filtro convencional de 0,22 µm, estos pueden obstruirse rápidamente por otro material, por lo que puede ser útil realizar etapas secuenciales de esterilización por filtración a través de una serie de filtros de tamaño de poro decreciente antes de usar un filtro de 0,22 µm. Ejemplos de filtros anteriores serían aquellos con un tamaño de poro de 0,8 µm, 0,45 µm, etc.

En algunas realizaciones las VME pueden prepararse artificialmente a partir de bacterias y pueden prepararse usando tratamiento con detergente (por ejemplo, con desoxicolato o sarkosilo) o por medios no detergentes (por ejemplo, véase la referencia 28). Las técnicas para formar vesículas incluyen el tratamiento de bacterias con un detergente de sal de ácido biliar (por ejemplo, sales de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc., prefiriéndose el desoxicolato sódico [29 y 30] para tratar *Neisseria*) a un pH suficientemente alto para no precipitar el detergente [31]. Otras técnicas pueden realizarse sustancialmente en ausencia de detergente [28] usando técnicas tales como sometimiento a ultrasonidos, homogeneización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, trituración, prensa francesa, combinación, etc. Los procedimientos que no usan detergente o con bajo contenido pueden retener antígenos útiles como NspA [28]. Por lo tanto, un procedimiento puede usar un tampón de extracción de VME con aproximadamente un 0,5 % de desoxicolato o inferior, por ejemplo, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,1 %, <0,05 % o cero.

Un procedimiento útil para la preparación de vesículas se describe en la referencia 32 e implica la ultrafiltración en VME brutas, en lugar de una centrifugación a alta velocidad. El procedimiento puede implicar una etapa de ultracentrifugación después de que tenga lugar la ultrafiltración.

Por lo tanto, las vesículas pueden obtenerse tratando una bacteria gramnegativa apropiada, por ejemplo, una bacteria de la divulgación de manera que su membrana externa forme vesículas y un procedimiento de preparación de vesículas a partir de la bacteria de la divulgación puede comprender o comprender adicionalmente tratar una bacteria gramnegativa apropiada, por ejemplo, una bacteria de la divulgación de manera que su membrana externa forme vesículas.

Liberación de grandes cantidades de vesículas

Se ha demostrado que los mutantes NHTi en los que NT013 o NT022 están inactivados liberan mayores cantidades de vesículas que el NHTi de tipo silvestre.

La bacteria de la divulgación en una realización puede liberar mayores cantidades de vesículas en el medio de cultivo, en comparación con la misma bacteria en la que la proteína que contiene el dominio catalítico LytM está activa. Esto puede ser un aumento de al menos el 10, el 20, el 50, el 100, el 150, el 200, el 250, el 500, el 600, el 700, el 800, el 900, el 1000 % en comparación con la misma bacteria en la que está activa la proteína que contiene el dominio catalítico LytM.

Alternativamente, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la producción de vesículas a partir de una bacteria gramnegativa, por ejemplo, en comparación con la misma bacteria en la que la proteína que contiene el dominio catalítico LytM está activa, que comprende modificar, por ejemplo, inactivar al menos una proteína que contiene un dominio catalítico LytM en la bacteria. Opcionalmente la bacteria se cultiva.

Producción de vesículas de membrana externa con una composición proteica diferente

Se ha demostrado que los mutantes NHTi en los que al menos una proteína que contiene el dominio catalítico LytM está inactivada generan vesículas que tienen diferentes composiciones de proteínas para NHTi de tipo silvestre.

Específicamente, en comparación con las vesículas de NHTi de tipo silvestre, las vesículas del mutante NT013 pueden tener un aumento en la cantidad de lipoproteína, un aumento en la cantidad de proteína periplásmica, una disminución en la cantidad de proteína de la membrana externa.

En comparación con las vesículas de NHTi de tipo silvestre, las vesículas del mutante NT017 pueden tener un

aumento en la cantidad de proteína citoplásmica y una disminución en la cantidad de proteína de la membrana externa. En comparación con las vesículas de NHTi de tipo silvestre, las vesículas del mutante NT022 pueden tener un aumento en la cantidad de lipoproteína, un aumento en la cantidad de proteína periplásmica, una disminución en la cantidad de proteína de la membrana externa.

- 5 Las lipoproteínas NT069 (anotadas como NTHI1957) y NTHI0353 pueden encontrarse a niveles aumentados en vesículas mutantes NTHi NT013 y NT022, en comparación con las vesículas de NHTi de tipo silvestre.

La serina proteasa periplásmica HhoA puede encontrarse a niveles aumentados en vesículas mutantes NTHi NT013 y/o a niveles disminuidos en vesículas mutantes NTHi NT017 y NT022, en comparación con las vesículas de NHTi de tipo silvestre.

- 10 La proteína de la membrana externa NTHI1668 puede encontrarse en niveles aumentados en vesículas mutantes NTHi NT013, NT017 y NT022, en comparación con las vesículas de NHTi de tipo silvestre. La proteína de membrana externa P2, que es una proteína abundante y variable, se encuentra en niveles disminuidos en vesículas mutantes NTHi NT013, NT017 y NT022 y el nivel de proteína P5 de la membrana externa también cambian en comparación con las vesículas de NHTi de tipo silvestre. La presencia de P2 y P5, se cree que contribuyen a la falta de reactividad cruzada en los sueros generados contra las VME de *Haemophilus* y, como tal, la reducción en P2 y/o P2+P5 total puede ser ventajosa, por ejemplo, en la producción de vesículas con reactividad cruzada mejorada.
- 15

- 20 De esta manera las vesículas de la divulgación pueden contener diferencias (por ejemplo, aumentos o disminuciones, por ejemplo, de al menos el 10, el 20, el 50, el 100, el 150, el 200, el 250, el 500, el 600, el 700, el 800, el 900, el 1000 %) en la cantidad total de proteína, la cantidad de lipoproteína, la cantidad de proteína periplásmica, la cantidad de proteína de la membrana externa y/o la cantidad de proteína citoplásmica en comparación con la misma bacteria en la que la proteína que contiene el dominio catalítico LytM está activa.

- 25 Así, las vesículas de la divulgación pueden contener diferencias (por ejemplo, aumentos o disminuciones, por ejemplo, de al menos el 10, el 20, el 50, el 100, el 150, el 200, el 250, el 500, el 600, el 700, el 800, el 900, el 1000 % en la cantidad de uno o más proteínas, por ejemplo, proteínas de membrana externa seleccionadas de (i) P2 NHTi, (ii) P5 NHTi y (iii) P2 NHTi + P5 NHTi total, en comparación con las vesículas de la misma bacteria en la que la proteína que contiene el dominio catalítico LytM está activa. Se hace referencia a P2 y P5 NTHi pero si las vesículas son de una bacteria gramnegativa diferente, el homólogo, ortólogo o parólogo de P2 o P5 en esa bacteria puede aumentar o disminuir.

- 30 La divulgación proporciona de esta manera un procedimiento para alterar la cantidad total de proteína, la cantidad de lipoproteína, la cantidad de proteína periplásmica, la cantidad de proteína de membrana externa y/o la cantidad de proteína citoplásmica en una vesícula de una bacteria gramnegativa, por ejemplo, en comparación con la misma bacteria en la que la proteína que contiene el dominio catalítico LytM está activa, que comprende modificar, por ejemplo, inactivar al menos una proteína que contiene un dominio catalítico LytM en la bacteria. Opcionalmente la bacteria se cultiva. Opcionalmente, la proteína de la membrana externa es P2 y/o P5. La alteración puede ser como se definió anteriormente.
- 35

Composiciones inmunogénicas y medicamentos

Las composiciones inmunogénicas de la divulgación pueden ser útiles como vacunas. Las vacunas de acuerdo con la divulgación pueden ser profilácticas (es decir, para evitar la infección) o bien terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas.

- 40 Las composiciones pueden ser de esta manera farmacéuticamente aceptables. Normalmente incluirán componentes además de los antígenos, por ejemplo, incluirán típicamente uno o más vehículo o vehículos y/o excipiente o excipientes farmacéuticos. Un análisis exhaustivo de tales componentes está disponible en la referencia 33.

- 45 Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) vesículas de la divulgación y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición es adecuada para uso farmacéutico. La divulgación también proporciona un procedimiento para preparar una composición tal, que comprende la etapa de mezclar vesículas de la divulgación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica es preferentemente una composición inmunogénica.

- 50 Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser cualquier sustancia que no induzca por sí misma la producción de anticuerpos dañinos para el paciente que recibe la composición y que puede administrarse sin una toxicidad indebida. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Algunas sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares (por ejemplo, estabilizantes, conservantes), también pueden estar presentes en dichos vehículos. Una descripción exhaustiva de los vehículos adecuados está disponible en la ref. 33.

- 55 Las composiciones se administrarán generalmente a un mamífero en forma acuosa. Antes de la administración, sin embargo, la composición puede haber estado en una forma no acuosa. Por ejemplo, aunque algunas vacunas se fabrican en forma acuosa, después se cargan y se distribuyen y se administran también en forma acuosa, otras

vacunas se liofilizan durante la fabricación y se reconstituyen en una forma acuosa en el momento de uso. Por lo tanto, una composición de la divulgación puede secarse, tal como una formulación liofilizada.

La composición puede incluir conservantes tales como timerosal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna esté en forma sustancialmente libre (es decir, que tenga menos de 5 µg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libre de timerosal. Se prefieren especialmente las vacunas que no contienen mercurio. Se prefieren particularmente las vacunas sin conservantes.

Para mejorar la estabilidad térmica, una composición puede incluir un agente protector frente a la temperatura. Se proporcionan detalles adicionales de dichos agentes más adelante.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 10+2 mg/ml NaCl. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrogenofosfato potásico, deshidrato de fosfato disódico, cloruro de magnesio, cloruro cálcico, etc.

Las composiciones tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg y más preferentemente, se encontrará en el intervalo de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones típicamente se incluirán en el intervalo de 5-20 mM.

El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1 y más típicamente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5 o entre 7,0 y 7,8.

La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirogénica, por ejemplo, contiene <1 UE (unidad de endotoxinas, una medida convencional) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten.

La composición puede incluir material para una sola inmunización o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit "multidosis"). Se prefiere la inclusión de un conservante en disposiciones multidosis. Como alternativa (o además) de incluir un conservante en las composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tenga un adaptador aséptico para la extracción de material.

Las vacunas para humanos se administran normalmente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a niños.

Las composiciones inmunogénicas de la divulgación también pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. Preferentemente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen uno o más adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2, analizado adicionalmente a continuación.

Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a:

- sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio, incluyendo hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos) y sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 34];
- emulsiones de aceite en agua, tales como emulsiones de escualeno-agua, incluyendo MF59 (escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 %, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador) [Capítulo 10 de la ref. 34; véanse también las ref. 35-37 y el capítulo 12 de la ref. 38], adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA);
- formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 34], tales como QS21 [39] e ISCOM [capítulo 23 de la ref. 34];
- virosomas y partículas similares a virus (VLP) [40-46];
- derivados bacterianos o microbianos, tales como derivados no tóxicos del lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A [47, 48], oligonucleótidos inmunoestimulantes [49-54], tales como IC-31™ [55] (desoxinucleótido que comprende la secuencia de 26-meros 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO: 23) y péptido policatiónico polimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de 11-meros KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 24) y toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de las mismas [56 - 65];
- inmunomoduladores humanos, incluyendo citocinas, tales como las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [66, 67], interferones (por ejemplo, interferón-γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral;
- bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como quitosano y derivados de los mismos, microesferas de ácido hialurónico esterificado [68] o mucoadhesivos, tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol

polivinílico, polivinilpirolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa [69];

- micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente de 200 nm a ~30 µm de diámetro y lo más preferentemente de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.);
- liposomas [Capítulos 13 y 14 de la ref. 34, ref. 70-72];
- éteres de polioxi-etileno y ésteres de polioxi-etileno [73];
- Formulaciones de PCPP [74 y 75];
- péptidos de muramilo, incluyendo N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramilo-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y *N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina* MTP-PE); y
- compuestos de imidazoquinolona, incluyendo Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M") [76 y 77].

Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la divulgación también pueden comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones adyuvantes pueden usarse en la divulgación: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [78]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [79]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [80]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [81]; (6) SAF, que contiene un 10 % de escualano, Tween 80™ al 0,4 %, polímero de bloque pluronic L121 al 5 % y thr-MDP, ya esté microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con formación de vórtice para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula. (7) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualano al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y estructura de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tales como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 34.

Se prefiere particularmente el uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio y los antígenos normalmente se adsorben a estas sales. El fosfato cálcico es otro adyuvante preferido. Otras combinaciones adyuvantes preferidas incluyen combinaciones de los adyuvantes Th1 y Th2, tales como CpG y alumbre o resiquimod y alumbre. Puede usarse una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL (esto se ha informado que es eficaz en la inmunización neumocócica [82]). Se prefiere el uso de un adyuvante MF59, en particular en caso de inmunización IM (intramuscular) o IP (intraperitoneal).

Las composiciones de la divulgación pueden provocar tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta inmunitaria humoral. Preferentemente, esta respuesta inmunitaria inducirá anticuerpos de larga duración (por ejemplo, neutralizantes) y una inmunidad mediada por células que puede responder rápidamente tras la exposición a NTHI.

Dos tipos de linfocitos T, linfocitos CD4 y CD8, generalmente se consideran necesarios para iniciar y/o mejorar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Los linfocitos T CD8 pueden expresar un correceptor de CD8 y se denominan comúnmente linfocitos T citotóxicos (CTL). Los linfocitos T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con antígenos presentados en moléculas del MHC de Clase I.

Los linfocitos T CD4 pueden expresar un correceptor de CD4 y se denominan comúnmente linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas MHC de clase II. Tras la interacción con una molécula del MHC de clase II, las células CD4 pueden secretar factores, tales como citocinas. Estas citocinas secretadas pueden activar linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, macrófagos y otras células que participan en una respuesta inmunitaria. Los linfocitos T auxiliares o las células CD4+ pueden dividirse adicionalmente en dos subconjuntos funcionalmente distintos: el fenotipo TH1 y los fenotipos TH2, que difieren en su función efectora y citocinas.

Las células TH1 activadas potencian la inmunidad celular (incluyendo un aumento en la producción de CTL específicos de antígeno) y por lo tanto, son particularmente valiosos en la respuesta a infecciones intracelulares. Las células TH1 pueden secretar uno o más de IL-2, IFN-γ y TNF-β. Una respuesta inmunitaria TH1 puede dar como resultado reacciones inflamatorias locales mediante la activación de macrófagos, células NK (citotóxicas naturales) y linfocitos T citotóxicos CD8 (CTL). Una respuesta inmunitaria TH1 también puede actuar para expandir la respuesta inmunitaria mediante la estimulación del crecimiento de linfocitos B y T con IL-12. Los linfocitos B estimulados por TH1 pueden secretar IgG2a.

Las células TH2 activadas potencian la producción de anticuerpos y por lo tanto, son valiosas para responder a infecciones extracelulares. Las células TH2 pueden secretar uno o más de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Una respuesta inmunitaria TH2 puede dar como resultado la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria para la protección futura.

- 5 Una respuesta inmunitaria potenciada puede incluir uno o más de una respuesta inmunitaria TH1 y una respuesta inmunitaria TH2 mejoradas.

Una respuesta inmunitaria TH1 puede incluir uno o más de un aumento en CTL, un aumento en una o más de las citocinas asociadas a una respuesta inmunitaria TH1 (tales como IL-2, IFN- γ y TNF- β), un aumento en los macrófagos activados, un aumento en la actividad NK o un aumento en la producción de IgG2a. Preferentemente, la respuesta inmunitaria TH1 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG2a.

10 Puede desencadenarse una respuesta inmunitaria TH1 usando un adyuvante de TH1. Un adyuvante de TH1 provocará generalmente niveles aumentados de producción de IgG2a con respecto a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes TH1 adecuados para su uso en la divulgación pueden incluir, por ejemplo, formulaciones de saponina, virosomas y partículas similares a virus, derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), oligonucleótidos inmunoestimulantes. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes, tales como los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG, son adyuvantes TH1 preferidos para su uso en la divulgación.

15 Una respuesta inmunitaria TH2 puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citocinas asociadas a una respuesta inmunitaria TH2 (tales como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) o un aumento en la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria. Preferentemente, la respuesta inmunitaria TH2 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG1.

20 Puede desencadenarse una respuesta inmunitaria TH2 usando un adyuvante de TH2. Un adyuvante de TH2 provocará generalmente niveles aumentados de producción de IgG1 con respecto a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes de TH2 adecuados para su uso en la divulgación incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, emulsiones de aceite y toxinas ribosilantes de ADP y derivados detoxificados de las mismas. Las composiciones que contienen minerales, tales como sales de aluminio son adyuvantes de TH2 preferidos para su uso en la divulgación.

25 Preferentemente, la divulgación incluye una composición que comprende una combinación de un adyuvante TH1 y un adyuvante TH2. Preferentemente, dicha composición desencadena una respuesta TH1 mejorada y una respuesta TH2 mejorada, es decir, un aumento en la producción tanto de IgG1 como de IgG2a con respecto a la inmunización sin un adyuvante. Aún más preferentemente, la composición que comprende una combinación de un adyuvante TH1 y uno TH2 provoca un aumento de las respuestas inmunitarias TH1 y/o un aumento de las respuestas inmunitarias TH2 con respecto a la inmunización con un solo adyuvante (es decir, con respecto a la inmunización con un adyuvante de TH1 solo o a la inmunización con un adyuvante TH2 solo).

30 La respuesta inmunitaria puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria TH1 y una respuesta TH2. Preferentemente, la respuesta inmunitaria posibilita una o ambas de una respuesta TH1 mejorada y una respuesta TH2 mejorada.

35 La respuesta inmunitaria mejorada puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica y una mucosa. Preferentemente, la respuesta inmunitaria posibilita una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica mejorada y una mucosa mejorada. Preferentemente, la respuesta inmunitaria mucosa es una respuesta inmunitaria TH2. Preferentemente, la respuesta inmunitaria mucosa incluye un aumento en la producción de IgA.

40 Las infecciones bacterianas pueden afectar a diversas áreas del cuerpo y, por lo tanto, las composiciones de la divulgación pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección también pueden prepararse (por ejemplo, una composición liofilizada o una composición secada por congelación). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como un comprimido o una cápsula, como una pulverización o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un pulverizado. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o pesario.

45 La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñada de tal manera que se reconstituye una composición combinada justo antes de su administración a un paciente. Dichos kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados.

50 Cuando va a prepararse una composición de manera extemporánea antes de su uso (por ejemplo, cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta en forma de kit, el kit puede comprender dos viales o puede comprender una jeringuilla ya cargada y un vial, usándose el contenido de la jeringa para reactivar el contenido del vial antes de la inyección.

55

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacuna comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno o antígenos, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo del estado de salud y físico del individuo que se vaya a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se vaya a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica por parte del médico tratante y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de pruebas rutinarias. En los casos en los que se incluye más de un antígeno en una composición, pueden estar presentes dos antígenos a dosis iguales entre sí o a diferentes dosis.

Como se ha mencionado anteriormente, una composición puede incluir un agente protector frente a la temperatura y este componente puede ser particularmente útil en las composiciones adyuvadas (en particular, aquellas que contienen un adyuvante mineral, tal como una sal de aluminio). Como se describe en la referencia 83, puede añadirse un agente protector contra la temperatura líquido a una composición de vacuna acuosa para reducir su punto de congelación, por ejemplo, para reducir el punto de congelación por debajo de 0 °C. Por lo tanto, la composición puede almacenarse a menos de 0 °C, pero por encima de su punto de congelación, para inhibir la desintegración térmica. El agente protector contra la temperatura también permite congelar la composición a la vez que impide la aglomeración de los adyuvantes de sales minerales tras la congelación y descongelación y también pueden proteger a la composición a temperaturas elevadas, por ejemplo, por encima de 40 °C. Pueden mezclarse una vacuna acuosa de partida y el agente protector contra la temperatura líquido de tal forma que el agente protector contra la temperatura líquido forma un 1-80 % en volumen de la mezcla final. Los agentes protectores contra la temperatura adecuados han de ser seguros para su administración a seres humanos, fácilmente miscibles/solubles en agua y no han de dañar otros componentes (por ejemplo, antígeno y adyuvante) en la composición. Los ejemplos incluyen glicerina, propilenglicol y/o polietilenglicol (PEG). Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular medio en el intervalo de 200-20.000 Da. En una realización preferida, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 300 Da ("PEG-300").

Debido a la naturaleza particulada de las vesículas, un producto de vacuna final puede ser una suspensión con una apariencia turbia. Esta apariencia significa que la contaminación microbiana no es fácilmente visible, por lo que la vacuna puede contener un agente antimicrobiano. Esto es particularmente importante cuando la vacuna se envasa en envases multidosis. Los antimicrobianos preferidos para la inclusión son 2-fenoxietanol y timerosal. Se prefiere, sin embargo, no usar conservantes mercuriales (por ejemplo, timerosal) y se prefiere que la composición contenga menos de aproximadamente 25 ng/ml de mercurio. Más preferentemente, la composición no contiene mercurio.

El trabajo previo con vacunas de vesículas (por ejemplo, para meningococo) ofrece orientación farmacéutica, posológica y de formulación para la administración de vesículas. La concentración de vesículas en las composiciones de la divulgación estará generalmente entre 10 y 500 µg/ml, preferentemente entre 25 y 200 µg/ml y más preferentemente de aproximadamente 50 µg/ml o aproximadamente 100 µg/ml (expresado en términos de proteína total en las vesículas). Dosis más bajas pueden ser eficaces para la seroconversión. Por lo tanto, la concentración de vesículas en las composiciones de la divulgación puede estar en el intervalo de 1 ng/ml a 10 µg/ml, o 1 ng/ml a 1 µg/ml, o 0,5 µg/ml a 50 µg/ml. Un volumen de dosificación de 0,5 ml es típico para inyección.

La composición puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

Inmunización

La divulgación también proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición de la divulgación. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica inmunidad mediada por anticuerpos y/o células. El procedimiento puede generar una respuesta de refuerzo.

La divulgación también proporciona composiciones de la divulgación para su uso en medicina o como un medicamento, por ejemplo, para aumentar la respuesta inmunitaria en un mamífero (por ejemplo, como composiciones inmunogénicas o como vacunas).

La respuesta inmunitaria puede ser contra bacterias gramnegativas.

La divulgación también proporciona composiciones de la divulgación en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmunitaria en un mamífero o para prevenir enfermedades en un mamífero y el uso de vesículas de la divulgación en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmunitaria en un mamífero o para prevenir enfermedades en un mamífero.

Al generar una respuesta inmunitaria en el mamífero mediante estos usos y procedimientos, el mamífero puede protegerse contra la infección bacteriana, por ejemplo, por bacterias gramnegativas tales como *H. influenzae*.

La divulgación es eficaz contra *H. influenzae* de diversos serotipos diferentes, pero puede ser particularmente útil en la protección contra la enfermedad resultante de la infección por *H. influenzae* no tipificable (NTHI). De acuerdo con

la divulgación, una infección puede estar asociada a una enfermedad o afección seleccionada de, por ejemplo, otitis media (incluyendo otitis media aguda), bronquitis, conjuntivitis, sinusitis, una infección del tracto urinario, neumonía, bacteriemia, artritis séptica, epiglottitis, neumonía, enfisema, pericarditis, celulitis, osteomielitis, infección del tracto respiratorio inferior o meningitis. La divulgación es particularmente útil para tratar o prevenir la inflamación del oído medio o para tratar o prevenir enfermedades de EPOC, al provocar una respuesta inmunitaria que evita que las bacterias se muevan desde la garganta hasta el oído medio a través de la trompa de Eustaquio, en la que se coloniza después el oído medio.

La divulgación también proporciona un kit que comprende un primer componente y un segundo componente en la que ni el primer componente ni el segundo componente es una composición de la divulgación como se ha descrito anteriormente, pero en la que el primer componente y el segundo componente pueden combinarse para proporcionar una composición de la divulgación como se ha descrito anteriormente. El kit puede incluir además un tercer componente que comprende uno o más de lo siguiente: instrucciones, jeringuilla u otro dispositivo de administración, adyuvante o solución de formulación farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también proporciona un dispositivo de suministro precargado con una composición inmunogénica de la divulgación.

El mamífero es preferentemente un ser humano, por ejemplo, un paciente humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad, etc. Un mamífero (por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, un paciente) puede estar en riesgo de contraer la enfermedad o puede ser una mujer embarazada, por ejemplo, mujer ('inmunización materna').

Una forma de verificar la efectividad del tratamiento terapéutico implica la monitorización de la infección bacteriana, por ejemplo, por *H. influenzae* después de la administración de las composiciones de la divulgación. Una forma de comprobar la efectividad del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias, de forma sistémica (tal como monitorizando el nivel de producción de IgG1 e IgG2a) y/o de forma mucosa (tal como monitorizando el nivel de producción de IgA), contra los antígenos en las composiciones de la divulgación después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la divulgación puede determinarse administrándolas a sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales tales como un modelo de chinchilla [84]) y después determinando parámetros convencionales que incluyen títulos ELISA (GMT) de IgG. Estas respuestas inmunitarias generalmente se determinarán alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición y se comparan con los valores determinados antes de la administración de la composición. Cuando se administra más de una dosis de la composición, puede hacerse más de una determinación posterior a la administración. Normalmente, las respuestas séricas de anticuerpos específicos de antígeno se determinan después de la inmunización pero antes de la exposición, mientras que las respuestas mucosales específicas de antígeno se determinan después de la inmunización y después de la exposición.

La efectividad de las composiciones de vacuna también puede determinarse *in vivo* mediante estudios de inmunización en modelos animales de infección bacteriana, por ejemplo, por *H. influenzae*, por ejemplo, en conejillos de indias, chinchillas o ratones, con las composiciones de vacuna. Uno de estos modelos se describe en la referencia 85.

Otro modelo animal útil que a usar para determinar la efectividad *in vivo* de las composiciones de vacuna de la divulgación se describe en la referencia 86.

Las composiciones de la divulgación se administrarán en general directamente a un paciente. Puede lograrse la administración directa mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular o al espacio intersticial de un tejido) o por vía mucosa, tales como por administración rectal, oral, (por ejemplo, comprimido, pulverización), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra mucosa.

La divulgación puede usarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa, preferentemente, para desencadenar una inmunidad sistémica y/o mucosa mejorada.

Preferentemente, la inmunidad sistémica y/o mucosa mejorada se refleja por una respuesta inmunitaria TH1 y/o TH2 mejorada. Preferentemente, la respuesta inmunitaria mejorada incluye un aumento en la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

La dosificación puede ser una pauta en una sola dosis o una pauta en múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta multidosis, las diversas dosis pueden administrarse por vías iguales o diferentes, por ejemplo, un cebado parenteral y un refuerzo mucoso, un cebado mucoso y un refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples se administrarán típicamente al menos con 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10

semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

Las vacunas preparadas de acuerdo con la divulgación pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Por lo tanto, un paciente humano puede ser menor de 1 año, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad y preferentemente, ≥ 65 años), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos o pacientes inmunodeficientes. Las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, sin embargo, y puede usarse más generalmente en una población.

Las vacunas producidas mediante la divulgación pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario o centro de vacunación) que otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna para el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubeola, una vacuna contra MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna contra MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra la tos ferina, una vacuna contra DTP, una vacuna conjugada contra *H. influenzae* de tipo b, una vacuna del virus de la polio inactivado, una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna conjugada meningocócica (tal como una vacuna tetravalente A-C-W135-Y), una vacuna contra el virus sincicial respiratorio, etc.

Inmunización de la mucosa

La divulgación proporciona las composiciones de la divulgación para la inmunización de la mucosa. La divulgación también proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de dicha composición inmunogénica al mamífero. La composición se administra preferentemente a través de la mucosa (a una superficie de la mucosa), por ejemplo, puede administrarse por vía intranasal.

Puede estar presente una toxina bacteriana de ribosilación de ADP y/o un derivado detoxificado de la misma que puede ser, por ejemplo, derivado de enterotoxina lábil al calor ("LT") de *E. coli*. El derivado puede tener una mutación desintoxicante en su subunidad A, por ejemplo, puede ser LT-K63 o LT-R72. En particular puede ser LT-K63. En otras realizaciones, no es LT-K63.

Se prefiere la administración intranasal de composiciones de la divulgación y un adyuvante LT-K63. Esto puede disminuir la carga bacteriana de *H. influenzae* en la nasofaringe, los pulmones y la sangre, y aumentar la tasa de supervivencia de los mamíferos infectados.

Componentes antigénicos adicionales de las composiciones de la divulgación

La divulgación también proporciona composiciones que comprenden además al menos un antígeno de *H. influenzae* no tipificable o al menos otro antígeno de *H. influenzae* no tipificable.

La divulgación también proporciona composiciones que comprenden además al menos un antígeno que no es un antígeno de *H. influenzae* no tipificable.

En particular, la divulgación también proporciona una composición que comprende uno o más polipéptidos de la divulgación y uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- un antígeno de *N. meningitidis* serogrupo A, B, C, W135 y/o Y.
- un antígeno sacárido o polipéptido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 87, 88, 89].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tales como virus inactivados [por ejemplo, 90, 91].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tales como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo 91, 92].
- un antígeno de difteria, tales como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la ref. 93] o el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo, 94].
- un antígeno del tétanos, tales como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 93].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tales como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, ref. 95 y 96].
- un antígeno pertussis celular completo
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 97].
- antígeno o antígenos de polio [por ejemplo, 98, 99] tal como IPV.
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubeola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la ref. 93].
- antígeno o antígenos de la gripe [por ejemplo, capítulo 19 de la ref. 93], tales como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 100].
- un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 101, 102].
- un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B).
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo 102, 103, 104].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 105].

- un antígeno del virus sincicial respiratorio, por ejemplo, una proteína F recombinante
- una composición de vacuna que comprende una vacuna conjugada (adsorbida) de difteria (D), tétanos (T), tos ferina (acelular, componente) (Pa), hepatitis B (ADNr) (VHB), poliomielitis (inactivado) (IPV) y *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), por ejemplo, Infanrix-hexa

5 La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales. Las combinaciones con una vacuna contra el VSR y/o con una vacuna que contiene DTPa son de particular interés.

Los antígenos de proteínas tóxicas pueden detoxificarse en caso necesario (por ejemplo, detoxificación de toxina pertussis por medios químicos y/o genéticos [96]).

10 En los casos en los que se incluye un antígeno de difteria en la composición, se prefiere incluir también un antígeno del tétanos y antígenos de pertussis. De forma similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos también se prefiere incluir antígenos diftéricos y de pertussis. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis también se prefiere incluir antígenos diftéricos y del tétanos. Por lo tanto, se prefieren las combinaciones de DTP.

15 Los antígenos sacáridos se encuentran preferentemente en forma de conjugados. Las proteínas vehículo para los conjugados incluyen toxina diftérica, toxina tetánica, la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [106], péptidos sintéticos [107,108], proteínas de choque térmico [109,110], proteínas de pertussis [111,112], proteína D de *H. influenzae* [113], citocinas [114], linfocinas [114], proteínas estreptocócicas, hormonas [114], factores de crecimiento [114], toxina A o B de *C. difficile* [115], proteínas de captación de hierro [116], etc. Una proteína vehículo preferida es el mutante CRM197 de la toxina diftérica [117].

20 Los antígenos en la composición estarán normalmente presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para generar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno.

Como una alternativa al uso de proteínas antigénicas en las composiciones inmunogénicas de la divulgación, puede usarse ácido nucleico (preferentemente, ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica el antígeno.

Los antígenos se adsorben preferentemente a una sal de aluminio.

25 **General**

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

El término "aproximadamente", en relación con un valor numérico x, es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

30 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "esencialmente" puede omitirse de la definición de la divulgación.

35 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es igual al comparar las dos secuencias. Pueden determinarse este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 118. Se determina un alineamiento preferido mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de hueco afín con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman es bien conocido y se desvela en la referencia 119.

40 **Breve descripción de los dibujos**

45 Figura 1: Expresión y localización subcelular de factores NTHi LytM. (A) Se realizaron análisis de transferencia Western en diferentes extractos de compartimentos celulares usando antisueros específicos generados contra NT013, NT017 y NT022. 1 - Proteína recombinante, 2 - extracto total TS, 3 extracto total KO, 4 - proteínas de membrana externa TS, 5 - proteínas de membrana externa KO, 6 - fracción periplásmica TS, 7 - fracción periplásmica KO, 8 - sobrenadante, TS 9 sobrenadante KO. Las flechas rojas indican las señales específicas. Como cabía esperar, no se observa reactividad específica con las cepas mutantes; sin embargo, los antisueros reaccionan de forma cruzada con otras bandas no específicas presentes también en las cepas de inactivación génica no se caracterizaron. (B) Análisis de microscopía de inmunofluorescencia en la cepa de tipo silvestre Hi176 y el mutante 176ΔNT022 confirmando la localización de la superficie de la proteína NT022. Las bacterias son rojas y los factores LytM en verde. (C) Modelo de localización de proteínas LytM en NTHi.

Figura 2: Caracterización fenotípica de NTHi de tipo silvestre Hi176 y de mutantes LytM. El fenotipo de agregación en cultivos líquidos de crecimiento estático durante 16 h a 37 °C (A) y UFC por mililitro (B) de recuentos de UFC se realizó a dos DO diferentes. La cepa 176ΔNT017 tiene una tasa de crecimiento y una UFC similar a la cepa original, mientras que los mutantes 176ΔNT013 y 176ΔNT022 mostraron una tasa de

crecimiento reducida y una UFC menor. (C) Imagen confocal que muestra la agregación bacteriana de las cepas 176ΔNT013 y 176ΔNT022, las bacterias se tiñen en rojo y Dapi en azul.

Figura 3: Microscopía confocal y electrónica en mutantes LytM. (A) Imágenes confocales de Hi176 ts, 176ΔNT013 y 176ΔNT022, Las bacterias se tiñen de rojo (anti bacteria total) y azul (DAPI). (B) Microscopía electrónica de barrido de 176 ts, 176ΔNT013 y 176ΔNT022. El mutante 176ΔNT017 no muestra ninguna diferencia en comparación con la cepa de tipo silvestre (datos no mostrados).

Figura 4: Formación de tabique en mutantes LytM. Microscopía electrónica de transmisión en Hi176 ts y mutantes LytM. Las flechas rojas indican una formación de tabique deteriorada en mutantes 176ΔNT013 y 176ΔNT022.

Figura 5: Los mutantes 176ΔNT013 y 176ΔNT022 liberan más VME que la cepa de tipo silvestre. Microscopía electrónica de transmisión de Hi176TS, mutantes 176ΔNT013 y 176ΔNT022 y de sus respectivas preparaciones de VME. Las flechas rojas indican VME que se liberan de la superficie bacteriana.

Figura 6: Análisis de VME. Gel de SDS page teñido con Coomassie de VME preparadas a partir de las cepas de tipo silvestre, 176ΔNT013 y 176ΔNT022 (A). La identificación por espectrometría de masas se realizó en bandas seleccionadas (B). Ensayo de luciferasa usando células HEK293 que expresan de manera estable el casete indicador NF-κB-luciferasa y TLR2 (C) o TLR4/MD2/CD14 (D). La estimulación de los receptores TLR se evalúa midiendo la actividad luciferasa inducida por NF-κB después de 6 horas de incubación con VME diluidas en serie. Los niveles de IL-6 y TNFα se midieron en hPBMC estimuladas (O.N.) con diferentes diluciones de VME purificadas de cepas ts y mutantes (E-F).

Figura 7: Análisis de proteínas encontradas en VME

Figura 8: Lipoproteínas en VME. VME de TS, ΔtolR, Δ17 tienen cantidades similares de lipoproteínas, mientras que los mutantes Δ13 y Δ22 están enriquecidos para las lipoproteínas, en particular lipoproteínas NTHI1957 y NTHI 0353.

Figura 9: Proteínas periplásmicas en VME. La proteína periplásmica principal es la serina proteasa periplásmica de HhoA. Esto es particularmente cierto a partir de la vesícula derivada de Δ13. En comparación con las VME generadas a partir del TS, las VME derivadas de ΔtolR y Δ22 están enriquecidas en proteínas periplásmicas. En comparación con las VME generadas a partir del TS, Las VME derivadas de Δ17 contienen una baja cantidad de proteínas periplásmicas.

Figura 10: Proteínas de la membrana externa en VME. De cada tipo de VME, las proteínas de membrana externa más abundantes son nt099 (proteína de membrana externa P2) y nt092 (proteína de membrana externa P5). La caída principal en la cantidad de proteína de la membrana externa observada para VME derivadas de Δ13 y Δ22 se debe a la reducción de P2.

Figura 11: Cantidades relativas de proteínas en VME. Cantidades relativas de proteínas nt067, nt014, nt022 y nt016 encontradas en VME producidas por cepas mutantes, con respecto a la cepa de tipo silvestre.

Figura 12: Tinción DAPI de MC58 Δ1483 y bacterias de tipo silvestre.

Figura 13: Análisis MET (A) y MEB (B) de MC58 Δ1483 y bacterias de tipo silvestre.

Figura 14: Análisis de proteínas de vesículas producidas por MC58 Δ1483 y bacterias de tipo silvestre.

Figura 15: Tinción DAPI de BP1721 de inactivación génica y bacterias de tipo silvestre.

Figura 16: Alineación múltiple para los homólogos de NlpD.

Figura 17: Alineación múltiple para los homólogos de YebA.

Figura 18: Alineación múltiple para los homólogos de EnvC.

Figura 19: Análisis de proteínas de vesículas producidas por Bp W28 9G/129K ΔNlpD y bacterias de tipo silvestre.

Modos para llevar a cabo la divulgación

Se generaron mutantes de inactivación génica de *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi) para tres metaloproteasas LytM: NTHI0532 (NT013), NTHI0915 (NT017) y NTHI0830 (NT022). Estos mutantes mostraron defectos en la superficie celular que provocaron un aumento en la liberación de vesículas de membrana externa (VME). Adicionalmente, Se demostró que estas proteínas están implicadas en la división celular bacteriana y la patogénesis. En particular, NT013 y NT022 son fundamentales para la escisión de peptidoglucano y la división celular. NT017 tiene una fuerte influencia en la colonización de NTHi y la evasión de inmunidad del hospedador.

PROCEDIMIENTOS

Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

Se usó la cepa NTHi 176 para este estudio. Fue parte de un estudio de cohorte de otitis media finlandesa, como aislado obtenido del oído medio. Se cultivó NTHi en agar chocolate polivitex (BioMerieux) incubado a 37 °C con un 5 % de CO₂. El caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI) (Difco Laboratories) suplementado con 10 µg/ml de hemina (Fluka Biochemika) y dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD, Sigma) se usó como medio de crecimiento fluido. *Escherichia coli* cepas DH5α, HK100 y BL21 (DE3) (Invitrogen) se usaron para la clonación y expresión de proteínas LytM. Se cultivaron a 37 °C en medio Luria Bertani (LB) y, cuando se requirió, se suplementó con ampicilina 100 µg/ml.

Cultivos celulares

Las células de cultivo de tejidos utilizadas en este estudio son células epiteliales de Chang (derivado de Wong-Kilbourne, clon 1-5c-4, conjuntiva humana, ATCC® CCL-20.2™) y HEK293 (riñón humano, ATCC® CRL1573™). Las células Chang se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM; Gibco) suplementado con Hepes 25 mM, L-glutamina 15 mM, antibióticos y suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 % (vol/vol) (FCS, Invitrogen Corporation). Se cultivaron a 37 °C con 5 % de CO₂.

Las células HEK293 que expresan de forma estable TLR2 o TLR4/MD2/CD14 y el casete indicador NF-κB-luciferasa, se cultivaron en DMEM que contenía 4,5 g/ml de glucosa, suplementado con 10 % de FBS inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, glutamina 2 mM, 5 µg/ml de puromicina, 250 µg/ml de higromicina (y más 10 µg/ml de blasticidina para células HEK293-TLR4).

Clonación de genes que codifican proteínas LytM

Los genes LytM se clonaron en el vector pET15b+ (Novagen) mediante el procedimiento de extensión de cebador incompleto de polimerasa (PIPE) (119). En resumen, las secuencias que codifican para cada proteína se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico HI176, retirando el péptido señal. Las PCR generaron mezclas de productos de extensión incompletos; para el diseño de cebadores, se introdujeron secuencias cortas superpuestas en los extremos de estas mezclas de extensión incompletas, lo que permitió que las cadenas complementarias se hibridaran y produjeran combinaciones híbridas de vector-inserto. Las células HK100 de *Escherichia coli* [120] se transformaron después con híbridos de inserción de vector. Se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina individuales y se verificó la presencia del plásmido recombinante por PCR. Los plásmidos de los clones positivos se aislaron y se subclonaron en células competentes *E. coli* BL21 (DE3).

Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Para la purificación de proteínas, una sola colonia de cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que expresa NTHI0532, NTHI0915 y NTHI0830 se inocularon en LB + ampicilina y se cultivaron durante la noche a 37 °C, se diluyeron en medio LB nuevo y se cultivaron a 30 °C a una DO de 0,6-0,8. La sobreexpresión de la proteína se indujo por la adición de 1 mM de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG; Sigma) durante 4 horas. Las proteínas recombinantes 6 x His-fusion se purificaron por cromatografía de afinidad en quelante conjugado Ni²⁺ de resina Sepharose 4B de flujo rápido (Pharmacia). La pureza se verificó mediante tinción por electroforesis SDS-PAGE con azul Coomassie. La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific).

Construcción de los mutantes de inactivación génica

Los mutantes eliminados de NTHI0532, NTHI0915 y NTHI0830 se construyeron mediante reemplazo alélico de cada gen completo con un casete de resistencia a eritromicina. Las regiones corriente arriba y corriente abajo de los tres genes se amplificaron por PCR usando los cebadores enumerados a continuación y se clonaron en el vector Stratagene pSC-A TOPO. El casete de resistencia a eritromicina se purificó del plásmido pIM13. Las construcciones que contienen regiones corriente arriba, se ensamblaron casetes de resistencia y regiones corriente abajo. Los plásmidos obtenidos se linealizaron y se usaron para transformar la cepa 176 NTHi usando el protocolo MIV [121]. Las cepas de inactivación génica obtenidas fueron confirmadas por PCR, Western Blot y secuenciación de locus.

NT013	NT013 5'DIR	TTGCACGCGCCAATAATACC	SEQ ID NO: 25
	NT013 5'INV	TGCATGCATTTACGTGTTGCACTGGCATC	SEQ ID NO: 26
	NT013 3'DIR	TGCATGCATTGTTTCGTGTTTCGTGAAGCAG	SEQ ID NO: 27
	NT013 3'INV	AACGCGATTGCGTAATGCAG	SEQ ID NO: 28
NT017	NT017 5'DIR	TGCTGGTGCAATTTGATCTTC	SEQ ID NO: 29
	NT017 5'INV	TGCATGCATTGATTAACGCCAAAACGCAAC	SEQ ID NO: 30
	NT017 3'DIR	TGCATGCATATTAGCCGTAAAGGAACGCC	SEQ ID NO: 31
	NT017 3'INV	TGGCGATCTAATGAACGCAC	SEQ ID NO: 32
NT022	NT022 5'DIR	AAACATTGTGCAACAATGGGG	SEQ ID NO: 33
	NT022 5'INV	TGCATGCATACAAGACTCAAAGGGAGTAAG	SEQ ID NO: 34
	NT022 3'DIR	TGCATGCATGGATCCAGTACGTTACCTAC	SEQ ID NO: 35
	NT022 3'INV	GTTTCTTTGTCCGCAGGTTC	SEQ ID NO: 36

Preparación de antisueros policlonales

Se inmunizaron grupos de cuatro ratones CD1 para producir antisueros policlonales; se usaron 10 µg de proteína purificada para cada ratón. La proteína recombinante se administró intraperitonealmente en presencia de aluminio. Se administraron una segunda (día 21) y una tercera (día 35) dosis de refuerzo. Se tomó una muestra de sangre el día 49.

Los tratamientos se realizaron de acuerdo con el comité ético interno de animales y las directrices institucionales.

Fraccionamiento celular y análisis de transferencia Western

Las cepas de *Haemophilus* se cultivaron en BHI hasta la mitad de la fase logarítmica a 37 °C con 5 % de CO₂.

Los lisados de células enteras y fracciones periplásmicas se purificaron usando el kit PeriPreps Periplasting de Epicentre. Las proteínas de la membrana externa (PME) se recuperaron sobre la base de la insolubilidad de Sarkosyl siguiendo el procedimiento rápido descrito por Carlone y col. [122].

Para preparar sobrenadantes de cultivo, las bacterias se cosecharon a 13000 g durante 10 min a 4 °C. Se filtró 1 ml de sobrenadante de cultivo a través de un filtro de 0,22 mm y se precipitó con un volumen de TCA al 50 % durante 1 hora a 4 °C.

Después de la centrifugación a 13000 g durante 30 minutos, El sedimento conseguido se lavó una vez con etanol al 70 % y se resuspendió en tampón de carga de muestra IX.

Las proteínas de cada fracción celular se separaron por electroforesis SDS-PAGE usando NuPAGE Gel System, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y se reveló por tinción con azul de Coomassie o se transfirió a membranas de nitrocelulosa para análisis de transferencia Western.

Las transferencias Western se realizaron de acuerdo con los procedimientos convencionales. Las diferentes proteínas LytM se identificaron con un antisuero policlonal de ratón producido contra NTHI0532 recombinante, NTHI0915 y NTHI0830 (diluido 1:1000) y un antisuero anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (DAKO), como anticuerpo secundario. Las bandas se visualizaron con sustrato quimioluminiscente Super Signal (Pierce) y con el kit de sustrato Opti 4CN (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Microscopia confocal

La presencia de proteínas LytM en la superficie NTHi se verificó mediante imágenes confocales. Se usaron mutantes de inactivación génica como controles negativos. Las bacterias se cultivaron hasta la fase exponencial y se fijaron en paraformaldehído al 4 % (Sigma). Después de múltiples lavados, las bacterias se extendieron sobre portaobjetos recubiertos con polilisina y se bloquearon con PBS + 3 % de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron y se incubaron con antisueros específicos (1:1000) durante 15 min a temperatura ambiente. Los antisueros LytM se absorbieron previamente con bacterias KO intactas para minimizar la reactividad cruzada. Las bacterias se lavaron varias veces con PBS y se incubaron con IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor 488 (1:400) (Molecular Probes). Las muestras marcadas se montaron con el reactivo antifade ProLong®Gold con DAPI (Molecular Probes) y se analizaron con el microscopio confocal ZeissLSM710.

Microscopia electrónica de barrido y de transmisión

La microscopía electrónica se realizó en cepas de 176ts y noqueadas para observar defectos en la morfología bacteriana. Las bacterias se cultivaron hasta la fase exponencial, se lavaron con PBS y se fijaron durante la noche en tampón de sacarosa cacodilato que contenía 2,5 % de glutaraldehído y 2,5 % de paraformaldehído. Las muestras fueron luego fijadas en OsO4 al 1 % y rojo de rutenio al 0,15 % en tampón de cacodilato, bloqueado con acetato de uranilo al 1 % y deshidratado con dilución en serie de acetona.

Para MEB, las muestras fueron secadas por el procedimiento de punto crítico usando CO₂ en una Unión Balzers CPD 020, recubierto por pulverización catódica con oro en una unidad Balzers MED 010, y observado con un microscopio electrónico JEOL JSM 5200. Para MET, las muestras fueron fijadas y deshidratadas como se describió anteriormente y luego incrustadas en resina basada en Epon. Se cortaron secciones delgadas con un ultramicrotomo Reichert Ultracut mediante el uso de un cuchillo de diamante, recogido en redes de cobre de colodión, teñido con acetato de uranilo y citrato de plomo, y observado con un microscopio electrónico JEOL 1200 EX II.

Preparación de vesículas de membrana externa

Las vesículas de membrana externa nativas (VME) se aislaron de cepas TS y mutantes, haciendo crecer las bacterias hasta la fase exponencial en 200 ml de cultivos BHI. Las bacterias se centrifugaron y el sobrenadante se filtró y se dejó a 4 °C durante la noche añadiendo inhibidor de proteasas y EDTA. El sobrenadante se ultracentrifugó durante 3 horas a un máximo de 200000 X g y el sedimento final que contenía VME se resuspendió en PBS.

Espectrometría de masas

Las bandas teñidas con Coomassie de SDS-PAGE se cortaron y se tiñeron en NH₄HCO₃ 50 mM 50 % de acetonitrilo. Después de una etapa de secado, las bandas se digirieron en gel con 12,5 ng/ml de tripsina en NH₄HCO₃ 5 mM toda la noche a 37° C. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido trifluoroacético (TFA) de concentración final al 0,1 % y las muestras se sometieron a análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF. Se detectó 1 µl de solución de digestión en una diana PAC (Prespotted AnchorChip 96, ajustado para Proteomics, Bruker Daltonics) y secados al aire a temperatura ambiente. Las manchas se lavaron con 0,6 µl de una solución de etanol al 70 % (vol/vol), 0,1 % (vol/vol) de TFA. Los espectros de masa peptídica se calibraron externamente usando los patrones previamente detectados en la diana. La determinación de masas moleculares de péptidos se realizó usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF UltraFlex (Bruker Daltonics, Bremen, GmbH). Los iones generados por desorción láser a 337 nm (láser N2) se registraron a un voltaje de aceleración de 25 kV en el modo reflector. En general, se acumularon aproximadamente 200 espectros individuales para mejorar la relación señal/ruído y se analizaron mediante FlexAnalysis (versión 2.4, Bruker Daltonics). Las huellas dactilares de péptidos se realizaron mediante búsquedas MASCOT contra la base de datos Haemophilus influenzae 86-028NP usando los siguientes parámetros: (i) 1 como número de escisiones perdidas permitidas, (ii) oxidación de metionina como modificación variable, (iii) 75 ppm como tolerancia peptídica. Solo se consideraron aciertos significativos, según lo definido por el sistema de puntuación y probabilidad MASCOT.

Ensayos de reactogenicidad

Para el ensayo de luciferasa, se sembraron células HEK293-TLR2 y HEK293-TLR4 en placas de fondo de micropocillos de 96 pocillos en 90 µl de medio completo en ausencia de antibióticos de selección. Después de la incubación durante la noche, las células se estimularon por duplicado con diferentes concentraciones de VME (10 µl/pocillo) a partir de 1 mg/ml diluido 1:2 en PBS, durante 6 h. Después, el medio se desechó y las células se lisaron con 20 µl de tampón de lisis pasivo (Promega) durante 20 min a temperatura ambiente. Los niveles de luciferasa se midieron mediante la adición de 100 µl/pocillo de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) usando un lector de microplacas LMax II384 (Molecular Devices). Las unidades de luz bruta (RLU) de cada muestra se dividieron por la RLU de la muestra de control (PBS) y se expresaron como Inducción de Plegamiento (FI).

Las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se aislaron de capas leucocíticas de donantes sanos usando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Amersham Biosciences). Las células se sembraron en placas de fondo de micropocillos de 96 pocillos en 180 µl de RPMI (GIBCO) suplementado con 10 % de FBS inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, glutamina 2 mM. Las células se estimularon con diferentes concentraciones de VME (20 µl/pocillo) a partir de 1 mg/ml diluido 1:2 en PBS, durante toda la noche. El ensayo de mesoescala 7 puntos proinflamatorios humanos (MSD Technology) se usa para la detección de citocinas inflamatorias siguiendo las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

NT013, NT017 y NT022 de NTHi muestran una homología significativa con varias proteínas LytM previamente caracterizadas expresadas por otras bacterias gramnegativas. En particular, las proteínas de *E. coli* conocidas por estar involucradas en el proceso de división celular tales como YebA, EnvC y NlpD muestran una identidad de aminoácidos del 49 % con NT013, el 40 % con NT017 y el 43 % con NT022, respectivamente. Los dominios catalíticos de LytM son las regiones más conservadas entre las proteínas NTHi y *E. coli*, de hecho, el porcentaje de homología crece hasta el 79 % para este dominio específico.

Las proteínas LytM se distribuyen de manera diferente en los compartimentos NTHi

Para verificar la expresión y la localización subcelular de las proteínas LytM NT013, NT017 y NT022, se generaron mutantes de delección única de los genes que codifican las tres proteínas LytM en la cepa NTHi176. Se realizó inmunotransferencia con antisueros específicos generados contra cada una de las proteínas recombinantes LytM para determinar el nivel de expresión en fracciones periplásmica, membrana externa y sobrenadante.

Como se muestra en la Figura 1A, NT013 se detectó en los extractos de proteínas de la membrana externa, NT017 en la fracción periplásmica, mientras que NT022 se encontró en todas las fracciones. Como control, ninguno de los antisueros reconoció bandas específicas a 53 kDa, 46 kDa y 42,5 kDa correspondientes a NT013, NT017 y NT022 en preparaciones celulares de las respectivas cepas mutantes inactivadas (Figura 1A).

Sorprendentemente, la microscopía de inmunofluorescencia confocal de bacterias teñidas para NT013 no reveló ninguna señal específica de la proteína en la superficie bacteriana, indicando que NT013 podría estar asociado a la capa interna de la membrana externa ya que se encontró que estaba presente en la fracción de membrana externa mediante análisis de transferencia western. Como cabía esperar, NT017, que se encontró en la fracción periplásmica, fue negativo por análisis de microscopía confocal y se confirmó que NT022 estaba expuesto en la superficie bacteriana (Figura 1B). De interés, parece que el antígeno se transloca en la superficie bacteriana en focos específicos cerca del tabique de división (Figura 1B). Un modelo de localización de proteínas se ilustra en la Figura 1C.

176ΔNT013 y 176ΔNT022 exhiben morfología celular aberrante y graves defectos de separación celular

Para investigar si las proteínas NTHi LytM, NT013 y NT022, jugaron un papel en la separación celular, se cultivaron mutantes de inactivación génica isogénicos únicos (176ΔNT013 y 176ΔNT022) en medio sólido o líquido y se compararon con la cepa de tipo silvestre. Estos no mostraron diferencias en la morfología de las colonias según lo visualizado por microscopía óptica. Para evaluar el efecto de las mutaciones, las cepas de inactivación génica se cultivaron en BHI líquido a 37 °C. No hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento de TS y mutantes, pero se observó un fenotipo de agregación en cultivos líquidos para 176ΔNT013 y 176ΔNT022 (Figura 2A) y se confirmó mediante imágenes confocales (Figura 2C). El número de colonias bacterianas también se midió a dos DO diferentes mediante cultivo en placa de dilución en serie en placas de chocolate con agar. Las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de 176ΔNT013 y 176ΔNT022 fueron mucho más bajas que el tipo silvestre Hi176 y de 176ΔNT017, de hecho, las UFC derivadas de 176ΔNT013 y 176ΔNT022 son, respectivamente, solo de aproximadamente 10 % y 1 % con respecto a la cepa original (Figura 2B).

Para verificar si el fenotipo de agregación bacteriana se debió a una falla en la separación celular, los presentes inventores usaron microscopía electrónica confocal y de barrido que mostró claramente que los mutantes 176ΔNT013 y 176ΔNT022 difieren del tipo salvaje en dimensión y morfología (Figura 3A y 3B).

En particular, las células 176ΔNT013 aparecieron aproximadamente cuatro veces más largas que la cepa de tipo silvestre y se comban en la porción central. Por otra parte, el mutante 176ΔNT022 forma cadenas más largas (hasta 0,1 mm), mientras que no se observaron diferencias morfológicas evidentes para 176ΔNT017. Se observó el mismo fenotipo cuando se generaron mutantes LytM en una cepa diferente (Hi162), lo que indica las propiedades funcionales ubicuas de tales determinantes.

Este resultado indica que NT013 y NT022 están implicados en la separación bacteriana, aunque no son esenciales para el crecimiento celular NTHi.

Los mutantes 176ΔNT013 y 176ΔNT022 liberan vesículas de membrana externa

Se observó formación de tabique defectuoso en mutantes 176ΔNT013 y 176ΔNT022 en microscopía electrónica de transmisión (MET) de superficies celulares bacterianas (Figura 4). Además, se destacó una formación exclusiva de ampollas en la superficie de ambos mutantes (Figura 5).

Se cree que esta formación de ampollas en la membrana se debe a una sobreproducción de vesículas de membrana externa (VEM) que son secretadas naturalmente por bacterias gramnegativas. Las VEM nativos se purificaron de estos dos mutantes y de la cepa Hi176 para verificar la calidad y cuantificar la liberación de VEM. El aislamiento de VEM reveló que ambas cepas mutantes producen más vesículas con respecto a la cepa de tipo silvestre (Figura 5). El análisis MET de las preparaciones de VEM confirmó la presencia de vesículas con un diámetro aparente de 20 a 100 nm (Figura 5). La sobreproducción de VEM en mutantes LytM se cuantificó y mostró un aumento cuádruple con respecto al TS (procedimiento de Lowry para la cuantificación de proteínas).

Composición proteica de vesículas de membrana externa

Para comparar la composición de proteínas de las VEM extraídas de cada cepa, las muestras se procesaron en un gel SDS-page y se realizó una tinción con azul Coomassie (Figura 6A). Los patrones de proteínas fueron similares entre las cepas mutantes y de tipo silvestre, aunque algunas bandas mostraron una intensidad diferente. Como cabía esperar, el análisis de espectrometría de masas asoció estas bandas a varios determinantes de superficie

conocidos, incluyendo HMW1 y 2, HtrA, P2, P5 y OMP26 (Figura 6B). Se hicieron comparaciones con el mutante TolR conocido y con el tipo silvestre.

Las VEM purificadas de las cepas mutantes se analizaron para determinar su contenido de proteína y se compararon con las VEM purificadas de la cepa de tipo silvestre basándose en espectroscopía de masas de bandas seleccionadas.

Las proteínas de *Haemophilus* se agruparon en cinco clases de acuerdo con su localización dentro de la célula y se midió la cantidad de proteína de cada clase presente en las VME. Se observaron diferencias entre el tipo silvestre y los mutantes y esto sugiere mecanismos distintos de formación de VEM (véase la Figura 7). Las VEM mutantes NT013 y NT022 mostraron cantidades aumentadas de lipoproteínas y cantidades reducidas de proteínas de la membrana externa. Las cantidades de proteínas individuales se cuantificaron dentro de cada clase. Los resultados para la lipoproteína, las clases de proteína periplásmica y de proteína de membrana externa se ilustran en la Figura 8, la Figura 9 y la Figura 10 respectivamente.

Una diferencia es una disminución en la cantidad de proteínas inmunodominantes de la membrana externa (proteína 2 y proteína 5) en las cepas mutantes (véase la Figura 10 y la Tabla a continuación). En particular, en el tipo silvestre, la cantidad de estos P2 y P5 es aproximadamente el 56 % del total, en Δ NT013 disminuye al 31 % y en Δ NT022 al 23 %. P2 y P5 son proteínas muy abundantes y variables y su presencia es una de las razones clave de la falta de reactividad cruzada en los sueros generados contra las VEM de *Haemophilus*. Por lo tanto las VEM mutantes con concentración reducida de P2 y P5 pueden usarse para mejorar la reactividad cruzada.

	176 TS	Δ TolR	Δ NT013	Δ NT022
Proteínas totales (ng)	101,546	100,127	101,567	102,663
P2	40,2	17,29	13,0889	11,129
P5	16,69	25,488	18,41	12,169
Proteínas totales - (P2+P5)	44,62	57,34	70,06	79,36
% de P2-P5	56,06	42,73	31,02	22,7
% resto de PME	43,94	57,27	68,98	77,3

A continuación se presenta un resumen de los datos proteómicos relacionados con los factores de virulencia en el mutante NT017:

Disminución >50 %			Similar			Aumento <50 %		
	ts	ko		ts	ko		ts	ko
HtrA	8,281	1,559	D15	1,429	1,529	Proteína 5	16,693	23,523
Omp26	3,441	2,202	Proteína 6	0,720	0,864	Proteasa Iga1	0	9,538
NT067	1,870	0,628	proteína periplásmica de unión a fosfato PstS	0,760	0,880	transportador ABC de ácidos grasos de cadena larga	0,648	1,670
Proteína E	0,234	0	NT016	0,701	0,575	HxuA	0	0,697
HMW2B	1,187	0 853	NT022	0,336	0,421	proteína de opacidad	0,469	1,106
			SurA	0,490	0,370			

Se realizaron estudios inmunológicos en VEM de tipos silvestres y mutantes para determinar si las diferencias observadas en los patrones de proteínas de VEM podrían influir en la activación de TLR por LPS o componentes de lipoproteínas. Las células HEK293-hTLR2 y HEK293-hTLR4/CD14-MD2 fueron estimuladas con diferentes diluciones de VEM de las cepas de tipo silvestre y de inactivación génica. No se detectaron diferencias significativas (Figura 6C/D).

Además la misma estimulación se extendió a las células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC) para medir la producción de citocinas proinflamatorias. No se observaron diferencias significativas (Figura 6 E/F).

Proteína LytM de inactivación génica en *Neisseria meningitidis*

Se identificaron tres proteínas LytM en *Neisseria meningitidis* MC58 y son: NMB1483, NMB0315 y NMB1333. NMB1483 contiene dos dominios LysM y un dominio de la familia de peptidasas M23 y es el homólogo de NlpD encontrado en *Neisseria meningitidis* el grupo B. NMB0315 también es una metalopeptidasa dependiente de zinc de tipo lisostafina que pertenece a la familia de peptidasa M23 y se caracteriza por un sitio activo conservado que contiene un motivo HXH. NMB1333 también presenta un dominio conservado típico de la familia de peptidasas M23. Las secuencias de genes y proteínas para las proteínas LytM se identificaron en *Neisseria meningitidis* se establecen en SEQ ID NO: 37-42.

Ácido nucleico NMB1483	SEQ ID NO:37
Ácido nucleico NMB0315	SEQ ID NO:38
Ácido nucleico NMB1333	SEQ ID NO:39
Proteína NMB1483	SEQ ID NO:40
Proteína NMB0315	SEQ ID NO:41
Proteína NMB1333	SEQ ID NO:42

Se generó un mutante de inactivación génica en la cepa MC58 de *Neisseria meningitidis* para el gen NMB1483 (NlpD) y se denominó: MC58Δ148. Una descripción detallada de la generación de mutantes de inactivación génica se describe en otra parte [123].

Las regiones de flanqueo de la secuencia de codificación del gen se amplificaron usando los siguientes conjuntos de cebadores:

Up1483_Fw1	gctctagaCGTTACAGCGGCAATTATTGC	XbaI	SEQ ID NO: 43
Up1483_Rv	tcccccgaggCGCAGACAGTACAGATAGTAC	SmaI	SEQ ID NO: 44
Dn1483_Fw	tcccccgaggATGTTCCGATATATAGCCTG	SmaI	SEQ ID NO: 45
Dn1483_Rv2	cgcctcgaCCCCTATTTTGTGGAACATC	XhoI	SEQ ID NO: 46

El plásmido usado para la generación del mutante de delección en MC58 fue: pBS-UD1483_Ery. Por intercambio alélico cromosómico, el gen fue sustituido por un casete de resistencia a la eritromicina.

La cepa MC58Δ1483 se analizó mediante análisis de microscopía confocal y mostró la presencia de múltiples agregados de tamaño variable, con respecto a la cepa TS. Para el análisis de microscopía confocal, las bacterias se cultivaron en medio GC hasta la fase exponencial (DO_{600} 0,5) y fijado en paraformaldehído al 4 %, antes de la tinción DAPI (Véase la Figura 12).

Para caracterizar aún más la morfología de las células bacterianas se realizó un análisis MET (microscopía electrónica de transmisión) y MEB (microscopía electrónica de barrido). Para el análisis MET, también se cultivaron bacterias en medio GC hasta la fase exponencial (DO_{600} 0,5). El análisis MET confirmó la presencia de agregados bacterianos y la morfología celular aberrante se mostró en MC58Δ1483, en comparación con el diplococo observado en la cepa TS. Además, la presencia de vesículas era claramente visible en la cepa mutante (véase la Figura 13A).

Para el análisis MEB, también se cultivaron bacterias en medio GC hasta la fase exponencial (DO_{600} 0,5). Además, el análisis MEB confirmó la presencia de agregados bacterianos tridimensionales y de morfología celular aberrante en el mutante MC58Δ1483 (véase la Figura 13B).

El mutante MC58Δ1483 también se probó por su capacidad para producir VEM. En un primer experimento, las cepas MC58 y MC58Δ1483 se cultivaron hasta la fase estacionaria (DO_{600} 1,3-1,5) en 50 ml de MCDM I (medio químicamente definido de meningitis I), en matraces agitadores de 250 ml incubados durante la noche a 37 °C, 5 % de CO_2 y 185 rpm.

Para el aislamiento de VEM, los cultivos se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 min a 4 °C y los sobrenadantes se filtraron usando botellas de filtro Stericup (tamaño de poro de 0,22 μ m).

Después se centrifugaron las muestras a 35.000 rpm (96.000 x g, promedio) a 4 °C durante 2 h, después se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente a 35.000 rpm (96.000 x g, promedio) a 4 °C durante 2 h. Después de la retirada del sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 200 a 500 μ l de PBS.

Para verificar la calidad de la preparación y comparar la cantidad de vesículas producidas por las cepas mutantes MC58 TS y MC58Δ1483, Se cargó el mismo volumen de OMV para el análisis SDS-PAGE y las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. Los resultados mostraron un patrón de proteína diferente en el mutante MC58Δ1483, en

comparación con la cepa TS. La cuantificación total de proteínas por el ensayo de Lowry mostró un aumento de dos veces en la producción de VEM a partir del mutante, en comparación con la cepa TS (Figura 14A)

En un segundo experimento, las cepas MC58 y MC58Δ1483 se cultivaron hasta la fase exponencial (DO₆₀₀ 0,5) en 40 ml de medio GC, en matraces agitadores de 250 ml incubados a 37 °C, 5 % de CO₂ y 185 rpm. Para el aislamiento de VEM, se siguió el mismo protocolo.

Los resultados del análisis SDS-PAGE mostraron proteínas VEM solo del mutante MC58Δ1483. No se detectaron proteínas cuando se cargó el mismo volumen de VEM de la cepa TS. También la cuantificación por el ensayo de Lowry confirmó la ausencia de VEM en la preparación de la cepa TS (Figura 14B).

Se realizan otras preparaciones de VEM y se realiza un análisis proteómico de espectrometría de masas de la muestra en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria. Se evalúa y compara la presencia de los principales antígenos de la vacuna 4CMenB.

Proteína LvtM de inactivación génica en *Bordetella pertussis*

Se identificaron seis peptidasas putativas en *Bordetella pertussis* Tohama I: BP1721, BP2956, BP0608, BP2919, BP3015 y BP1017. BP1721 y BP2919 tienen un dominio Lys-M (implicado en la unión a peptidoglicano) y un dominio Lyt-M (metalopeptidasas de tipo lisostafina) como NlpD de *E. coli* y NT022 de NTHi, las otras cuatro proteínas tienen solo el dominio Lyt-M. La organización del locus no ayuda a discriminar los diferentes homólogos, con la excepción de BP1721 que puede identificarse claramente como el homólogo de NlpD en *B. pertussis*. Las alineaciones múltiples mostraron una alta conservación del sitio catalítico de peptidasa entre BP2956 y NT013 y entre BP0608 y NT017. Las secuencias de genes y proteínas se muestran en SEQ ID NO: 47-58. BP1721 es un homólogo de NlpD. BP2956 es un supuesto homólogo NT013/YebA. BP0608 es un supuesto homólogo NT017/EnvC.

	Secuencia de ácido nucleico	Secuencia de proteína
BP1721	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53
BP2956	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:54
BP0608	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:55
BP2919	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:56
BP3015	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:57
BP1017	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:58

Se generó un mutante de inactivación génica en la cepa W28 9K-129G de *Bordetella pertussis* para el gen BP1721 (homólogo de NlpD). Las regiones de flanco de la secuencia de codificación del gen se amplificaron usando los siguientes conjuntos de cebadores:

BP1721 5' Dir	ccgGAATTCGCGGTTGCGCGCGCAGGGCAT	SEQ ID NO:59
BP1721 5' Inv	ggaGGATCCACGATTCTCTGTTTGCTCAA	SEQ ID NO:60
BP1721 3' Dir	ggaGGATCCCGCCACGCTCGTTTTCGACC	SEQ ID NO:61
BP1721 3' Inv	cccAAGCTTCCACGTCGGTCTCGCAGTACG	SEQ ID NO:62

La eliminación del gen BP1721 se obtuvo de la siguiente manera:

Se clonó un casete de resistencia a la kanamicina entre las regiones flanqueantes BP1721 en el vector suicida pSORTP1. La construcción pSORTP1-BP1721KO se introdujo en *B. pertussis* por conjugación. La integración del plásmido en el cromosoma después del primer evento de cruce se seleccionó por resistencia a gentamicina (presente en la estructura principal del plásmido) y resistencia a la kanamicina (presente en el inserto del plásmido). La pérdida del plásmido después del segundo evento de cruce y el reemplazo del gen BP1721 con el casete de kanamicina se seleccionó por resistencia a estreptomycin (el plásmido confiere sensibilidad a estreptomycin) y resistencia a kanamicina. El reemplazo del gen BP1721 con el casete de kanamicina se confirmó mediante amplificación por PCR usando cebadores externos a las regiones flanqueantes de BP1721 y usando *B. pertussis* W29 9K/129G como control. Los tamaños esperados de los productos de amplificación fueron 2189 pb para la cepa TS y 2574 pb para la cepa KO. Los cebadores usados fueron: BP1721 EXT 5' DIR: AACCTGGGCTTGAAGTCC (SEQ ID NO:63); BP1721 EXT 3' INV: ACACCAGCCAGGTATTGA (SEQ ID NO:64).

Los agregados celulares, que podrían deberse a mecanismos alterados de división celular, ya eran visibles desde el cultivo cuando la bacteria se cultivó en medio líquido. Los defectos de división celular se confirmaron posteriormente mediante análisis de microscopía confocal. Para el análisis de microscopía, se fijaron 50 µl de un cultivo líquido con

paraformaldehído al 4 % y se tiñeron con DAPI para visualizar el ADN. La cepa KO exhibió claramente un fenotipo de encadenamiento celular grave, en comparación con la cepa TS. (Véase la Figura 15).

Las cepas Bp W28 9G/129K y Bp W28 9G/129K Δ NlpD se cultivaron hasta la fase exponencial (DO_{600} 4,3-4,8) en 40 ml de caldo Stainer-Scholte (suplementado con estreptomina 400 μ g/ml) en matraces agitadores de 250 ml e incubados a 35 °C y 180 rpm.

Para el aislamiento de VEM, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 45 min a 4 °C y los sobrenadantes se filtraron usando botellas de filtro Stericup (tamaño de poro de 0,22 μ m). Las muestras fueron centrifugadas a 96000 x g a 4 °C durante 2 h, después se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente a 96.000 x g a 4 °C durante 2 h. Después de la retirada del sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 200 μ l de PBS.

Para verificar la calidad de la preparación y comparar la cantidad de vesículas producidas por las cepas Bp W28 9G/129K y Bp W28 9G/129K Δ NlpD, se cargó el mismo volumen de OMV (10 μ l) para el análisis de SDS-PAGE y las proteínas se tiñeron con SimpleBlue™ SafeStain (Life Technologies). Los resultados mostraron un patrón de proteína diferente en el mutante, en comparación con la cepa TS (véase la Figura 19).

Se genera un mutante de inactivación génica en la cepa W28 9K-129G de *Bordetella pertussis* para el gen BP2956 (supuesto NT013/homólogo de YebA). Las regiones de flanco de la secuencia de codificación del gen (negrita) se amplificaron usando los siguientes conjuntos de cebadores:

BP2956 5' Dir	ccgGAATTCATCAAGAAGCTGGGACGT	SEQ ID NO:65
BP2956 5' Inv	ggaGGATCCAACCTTTGCGTTTGAAGCT	SEQ ID NO:66
BP2956 3' Dir	ggaGGATCCCAAGCAGCAGATCAAGCT	SEQ ID NO:67
BP2956 3' Inv	cccAAGCTTGTCGGCGTCGTAAGGCTG	SEQ ID NO:68

La eliminación del gen BP2956 se obtiene de la siguiente manera. Se clona un casete de resistencia a cloranfenicol entre las regiones flanqueantes BP2956 en el vector suicida pSORTP1. La construcción pSORTP1-BP2956_{KO} se introduce en *B. pertussis* por conjugación. La integración del plásmido en el cromosoma después del primer evento de cruce se selecciona por resistencia a gentamicina (presente en la estructura principal del plásmido) y resistencia a cloranfenicol (presente en el inserto del plásmido). La pérdida del plásmido después del segundo evento de cruce y el reemplazo del gen BP2956 con el casete de kanamicina se selecciona por resistencia a estreptomina (el plásmido confiere sensibilidad a estreptomina) y resistencia a cloranfenicol.

Estas cepas mutantes de delección se analizan por su morfología celular, producción de VME y caracterización proteómica. En particular, se evalúa la presencia de la mayoría de los antígenos inmunogénicos (PT, FHA y 69K) de *B. pertussis*. Finalmente, estos mutantes se analizan *in vitro* por su función en la fisiología y/o la patogénesis de *B. pertussis* y las VME producidas se prueban en estudios de inmunogenicidad y reactividad cruzada.

Mutantes de inactivación génica para los otros supuestos homólogos de la proteína LytM: las regiones de flanco de la secuencia de codificación del gen (negrita) se amplificaron usando los siguientes conjuntos de cebadores:

BP0608 5' Dir	ccgGAATTCCTGGAAAACCGTTTCACGG	SEQ ID NO:69
BP0608 5' Inv	ggaGGATCCGAATCAGTCCTTTTTTCGC	SEQ ID NO:70
BP0608 3' Dir	ggaGGATCCATAAATATCGGGAAGTGT	SEQ ID NO:71
BP0608 3' Inv	cccAAGCTTCCGAGTTCCTTCAGATGG	SEQ ID NO:72
BP2919 5' Dir	ccgGAATTCATGATGCCGACTTGAT	SEQ ID NO:73
BP2919 5' Inv	ggaGGATCCTGAAAGAGGCAGCAAAAC	SEQ ID NO:74
BP2919 3' Dir	ggaGGATCCCGGCGAAACAGCACGTA	SEQ ID NO:75
BP2919 3' Inv	cccAAGCTTAGTTCGAAGCTGGCATTG	SEQ ID NO:76
BP3015 5' Dir	ccgGAATTCCTGCGATATCGGTTTTTC	SEQ ID NO:77
BP3015 5' Inv	ggaGGATCCTTGATCCTGTTATTTGA	SEQ ID NO:78
BP3015 3' Dir	ggaGGATCCGTTAACTGGATCGTTTC	SEQ ID NO:79
BP3015 3' Inv	cccAAGCTTTCGAAGCCGAATTCGTTA	SEQ ID NO:80

BP1017 5' Dir	ccgGAATTCAGCAGATGCGCCAGATCA	SEQ ID NO:81
BP1017 5' Inv	ggaGGATCCTTGCCTCGGTCTTGCCCT	SEQ ID NO:82
BP1017 3' Dir	ggaGGATCCTTCGGCGTATTGCAGTTC	SEQ ID NO:83
BP1017 3' Inv	cccAAGCTTTGAGTACCTGCCTATCGT	SEQ ID NO:84

- [1] WO2006/046143.
 [2] Berlanda Scorza y col. (2008) Mol Cell Proteomics 7:473-85.
 [3] Patente europea 0011243.
 [4] Fredriksen y col. (1991) NIPHAnn. 14(2):67-80.
 [5] WO2004/019977.
 [6] Hozbor y col. (1999) Curr Microbiol 38:273-8.
 [7] Tan y col. (2010) N Engl J Med. 362(16):1511-20.
 [8] Koeberling (2008) J Infect Dis. 198(2):262-70.
 [9] Uehara T. y col., The EMBO Journal (2010) 29, 1412-1422
 [10] Bernadac A., y col. (1998) Journal of Bacteriology 180 (18): 4872-4878
 [11] WO2002/062378
 [12] Rawlings y col. (2006) Nucleic Acids Res. 1 ene;34 :D270-2
 [13] Kessler y col. In A. J. Barrett, N. D. Rawlings y J. F. Woessner (ed.), Handbook of proteolytic enzymes 1998, p. 1476-1478 1a ed. Academic Press, Londres, Reino Unido
 [14] Hogg y col. (2007) Genome Biology 8:R103.
 [15] Needleman & Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
 [16] Rice y col. (2000) Trends Genet 16:276-277.
 [17] WO02/09746.
 [18] WO01/09350.
 [19] WO02/062378.
 [20] WO2004/014417.
 [21] Heterologous Gene Expression in E.coli: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (eds. Evans & Xu) Humana Press 2010 (ISBN 1617379662).
 [22] WO2010/010983
 [23] WO2011/161551
 [24] Anogv y col. (2008;) PLoS ONE 3(5):e2189
 [25] WO02/09643.
 [26] Katial y col. (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
 [27] WO2011/036562
 [28] WO2004/019977.
 [29] Patente europea 0011243.
 [30] Fredriksen y col. (1991) NIPHAnn. 14(2):67-80.
 [31] WO01/91788.
 [32] WO2005/004908.
 [33] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20a edición, ISBN: 0683306472.
 [34] Vaccine Design (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 [35] WO90/14837.
 [36] Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
 [37] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
 [38] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [39] US 5.057.540.
 [40] Niiikura y col. (2002) Virology 293:273-280.
 [41] Lenz y col. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
 [42] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
 [43] Gerber y col. (2001) J Virol 75:4752-4760.
 [44] WO03/024480.
 [45] WO03/024481.
 [46] Gluck y col. (2002) Vaccine 20:B10-B16.
 [47] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
 [48] Pajak y col. (2003) Vaccine 21:836-842.
 [49] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
 [50] McCluskie y col. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.
 [51] WO98/40100.
 [52] US 6.207.646.
 [53] US 6.239.116.
 [54] US 6.429.199.
 [55] Schellack y col. (2006) Vaccine 24:5461-72.

- [56] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [57] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- [58] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
- [59] Pizza y col. (2001) Vaccine 19:2534-2541.
- 5 [60] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- [61] Scharton-Kersten y col. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.
- [62] Ryan y col. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
- [63] Partidos y col. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
- [64] Peppoloni y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.
- 10 [65] Pine y col. (2002) J Control Release 85:263-270.
- [66] WO99/40936.
- [67] WO99/44636.
- [68] Singh y col.] (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [69] WO99/27960.
- 15 [70] US 6.090.406.
- [71] US 5.916.588.
- [72] EP-A-0626169.
- [73] WO99/52549.
- [74] Andrianov y col. (1998) Biomaterials 19:109-115.
- 20 [75] Payne y col. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.
- [76] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [77] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- [78] WO99/11241.
- [79] WO94/00153.
- 25 [80] WO98/57659.
- [81] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- [82] Ogunniyi y col. (2001) Infect Immun 69:5997-6003.
- [83] WO2006/110603.
- [84] Mason y col. (2003) Infect Immun 71:3454-3462.
- 30 [85] Zwijnenburg y col. (2001) J Infect Dis 183:1143-6.
- [86] Cheeseman M. T. y col. (2011) PLoS Genetics 7 (10): e1002336.
- [87] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
- [88] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.
- [89] Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
- 35 [90] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
- [91] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
- [92] Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Supl:S63-68 & 79-80.
- [93] Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [94] Del Giudice y col. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
- 40 [95] Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- [96] Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- [97] Costantino y col. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- [98] Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
- [99] Zimmerman y Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
- 45 [100] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107.
- [101] Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6.
- [102] WO02/34771.
- [103] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii.
- [104] Ferretti y col. (2001) PNAS USA 98: 4658-4663.
- 50 [105] Kuroda al. (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
- [106] EP-A-0372501
- [107] EP-A-0378881
- [108] EP-A-0427347
- [109] WO93/17712
- 55 [110] WO94/03208
- [111] WO98/58668
- [112] EP-A-0471177
- [113] WO00/56360
- [114] WO91/01146
- 60 [115] WO00/61761
- [116] WO01/72337
- [117] Research Disclosure, 453077 (Ene 2002)
- [118] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Suplemento 30.
- [119] Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.
- 65 [120] Klock y col. (2005) J. Struct. Funct. Genomics, 6:89-94
- [121] Herriott, y col. (1970) J. Bacteriol., 101:517-524.

[122] Carlone y col. (1986) J Clin Microbiol. 24(3): 330-332.

[123] Echenique-Rivera H, y col. (2011) PLoS Pathog. Mayo;7(5)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

5 <120> BACTERIAS MUTANTES PARA LA PRODUCCIÓN DE MÓDULOS GENERALIZADOS PARA ANTÍGENOS DE MEMBRANA

<130> PAT056149-WO-PCT

<141> 24/04/2014

<160> 87

10 <170> SeqWin2010, versión 1.0

<210> 1

<211> 475

<212> PRT

<213> Haemophilus influenzae

15 <400> 1

ES 2 808 659 T3

Met	Pro	Val	Gln	His	Val	Lys	Leu	Ala	Arg	Asp	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	1	5	10	15
Thr	Tyr	Ile	Lys	Val	Gly	Val	Phe	Phe	Val	Ala	Ile	Leu	Leu	Ile	Leu	20	25	30	
Thr	Gly	Ile	Leu	Leu	Thr	Ile	Lys	Asp	Lys	Ser	Glu	Glu	Asn	Pro	Ile	35	40	45	
Phe	Ser	Thr	Ser	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	His	Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Pro	50	55	60	
Asn	Lys	Asn	Ser	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Asp	Glu	Asp	Ala	Thr	Ser	Tyr	65	70	75	80
Asp	Asp	Glu	Leu	Gln	Ala	Lys	Asp	Asp	Glu	Val	Asp	Glu	Val	Lys	Leu	85	90	95	
Ser	Ser	Asp	Asp	Leu	Gly	Thr	Leu	Pro	Gln	His	Ala	Gln	Asp	Ala	Leu	100	105	110	
Asn	Gly	Leu	Leu	Asp	Ala	Ala	Asp	Gln	Ala	Ile	Arg	Ile	Thr	Asp	Gln	115	120	125	
Phe	Ser	Tyr	Thr	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Lys	Asp	Val	Leu	Val	130	135	140	
Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Asp	Ser	Ser	Val	Gln	Pro	Leu	Ile	Lys	Leu	Asp	145	150	155	160
Pro	Glu	Leu	Ala	His	Leu	Lys	Ala	Gly	Gln	Gln	Phe	Tyr	Trp	Ile	Leu	165	170	175	
Asn	Lys	Asn	Asp	Asn	Leu	Glu	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Val	Ser	Glu	Lys	180	185	190	
Glu	Glu	Arg	Ile	Tyr	Glu	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Lys	Phe	Lys	Arg	Gln	195	200	205	
Val	Ile	Glu	Lys	Lys	Ser	Ile	Trp	Arg	Lys	Glu	Val	Leu	Lys	Gly	Glu	210	215	220	

ES 2 808 659 T3

Ile	Gln	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Ser	Leu	Arg	Glu	Gln	Gly	Leu	Asp	Thr	225	230	235	240
Arg	Gln	Ile	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Ala	Leu	Gln	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	245	250	255	
Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Gly	Thr	Gln	Phe	Ala	Ile	Leu	Val	Ser	Arg	Glu	260	265	270	
Tyr	Leu	Gly	Asp	Lys	Leu	Thr	Gly	Gln	Gly	Asn	Val	Glu	Ala	Leu	Arg	275	280	285	
Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Gly	290	295	300	
Arg	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Gln	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Lys	Gly	Phe	Ala	Arg	305	310	315	320
Tyr	Pro	Leu	Gln	Arg	Gln	Ala	Arg	Val	Ser	Ser	Pro	Phe	Asn	Pro	Asn	325	330	335	
Arg	Arg	His	Pro	Val	Thr	Gly	Arg	Val	Arg	Pro	His	Lys	Gly	Val	Asp	340	345	350	
Phe	Ser	Val	Ser	Gln	Gly	Thr	Pro	Val	Ile	Ala	Pro	Ala	Asp	Gly	Thr	355	360	365	
Val	Glu	Lys	Val	Ala	Tyr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Arg	Tyr	Val	Met	370	375	380	
Leu	Arg	His	Gly	Arg	Glu	Tyr	Gln	Thr	Val	Tyr	Met	His	Leu	Ser	Lys	385	390	395	400
Ser	Leu	Val	Lys	Ala	Gly	Gln	Thr	Val	Lys	Lys	Gly	Glu	Arg	Ile	Ala	405	410	415	
Leu	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Ile	Ser	Thr	Gly	Pro	His	Leu	His	Tyr	Glu	420	425	430	
Phe	Arg	Ile	Asn	Gly	Arg	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Thr	Val	Lys	Leu	Pro	435	440	445	
Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Met	Thr	Ser	Ala	Glu	Arg	Lys	Gln	Phe	Leu	Val	450	455	460	
Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Glu	Lys	Met	Leu	Lys	Pro						465	470	475	

<210> 2

<211> 97

<212> PRT

<213> Haemophilus influenzae

<400> 2

ES 2 808 659 T3

Arg	Pro	His	Lys	Gly	Val	Asp	Phe	Ser	Val	Ser	Gln	Gly	Thr	Pro	Val
1				5					10					15	
Ile	Ala	Pro	Ala	Asp	Gly	Thr	Val	Glu	Lys	Val	Ala	Tyr	Gln	Ala	Gly
			20					25					30		
Gly	Ala	Gly	Arg	Tyr	Val	Met	Leu	Arg	His	Gly	Arg	Glu	Tyr	Gln	Thr
		35					40					45			
Val	Tyr	Met	His	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Val	Lys	Ala	Gly	Gln	Thr	Val
	50					55					60				
Lys	Lys	Gly	Glu	Arg	Ile	Ala	Leu	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Ile	Ser	Thr
65					70					75					80
Gly	Pro	His	Leu	His	Tyr	Glu	Phe	Arg	Ile	Asn	Gly	Arg	Ala	Val	Asn
				85					90					95	

Pro

<210> 3

<211> 410

<212> **PRT**

<213> Haemophilus **influenzae**

<400> 3

ES 2 808 659 T3

Met	Leu	Arg	Phe	Gly	Val	Asn	Gln	Lys	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	1	5	10	15
Leu	Leu	Ser	Cys	Gly	Leu	Leu	Ile	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	Gln	Ser	Ser	20	25	30	
Asp	Leu	Asn	Gln	Ile	Gln	Lys	Gln	Ile	Lys	Gln	Gln	Glu	Ser	Lys	Ile	35	40	45	
Glu	Lys	Gln	Lys	Arg	Glu	Gln	Ala	Lys	Leu	Gln	Ala	Asn	Leu	Lys	Lys	50	55	60	
His	Glu	Ser	Lys	Ile	Asn	Thr	Val	Glu	Gly	Glu	Leu	Leu	Glu	Thr	Glu	65	70	75	80
Ile	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Arg	Lys	Gln	Ile	Ala	Asp	Ala	Asp	Lys	Gln	85	90	95	
Phe	Lys	Gln	Leu	Glu	Lys	Gln	Glu	Arg	Glu	Gln	Lys	Ala	Arg	Leu	Ala	100	105	110	
Lys	Gln	Met	Asp	Ile	Ile	Tyr	Arg	Ser	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Leu	Ile	115	120	125	
Glu	Arg	Met	Phe	Ala	Gln	Asp	Pro	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Met	Lys	Val	130	135	140	
Tyr	Tyr	Gln	His	Leu	Asn	Gln	Val	Arg	Ile	Glu	Met	Ile	Asp	Asn	Leu	145	150	155	160
Lys	Ala	Thr	Gln	Ala	Gln	Ile	Ala	Val	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Leu	Ala	165	170	175	
Gln	Gln	Lys	Asn	His	Arg	Asn	Gln	Leu	Ser	Thr	Gln	Lys	Lys	Gln	Gln	180	185	190	
Gln	Ala	Leu	Gln	Lys	Ala	Gln	Gln	Glu	His	Gln	Ser	Thr	Leu	Asn	Glu	195	200	205	
Leu	Asn	Lys	Asn	Leu	Ala	Leu	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Asn	Ala	Leu	Lys	210	215	220	
Ala	Asn	Glu	Gln	Ala	Leu	Arg	Gln	Glu	Ile	Gln	Arg	Ala	Glu	Gln	Ala	225	230	235	240

Ala Arg Glu Gln Glu Lys Arg Glu Arg Glu Ala Leu Ala Gln Arg Gln
245 250 255

Lys Ala Glu Glu Lys Arg Thr Ser Lys Pro Tyr Gln Pro Thr Val Gln
260 265 270

Glu Arg Gln Leu Ile Asn Ser Thr Ser Gly Leu Gly Ala Ala Lys Lys
275 280 285

Gln Tyr Ser Leu Pro Val Ser Gly Ser Ile Leu His Thr Phe Gly Ser
290 295 300

Ile Gln Ala Gly Glu Val Arg Trp Lys Gly Met Val Ile Gly Ala Ser
305 310 315 320

Ala Gly Thr Pro Val Lys Ala Ile Ala Ala Gly Arg Val Ile Leu Ala
325 330 335

Gly Tyr Leu Asn Gly Tyr Gly Tyr Met Val Ile Val Lys His Gly Glu
340 345 350

Thr Asp Leu Ser Leu Tyr Gly Phe Asn Gln Ala Val Ser Val Lys Val
355 360 365

Gly Gln Leu Val Ser Ala Gly Gln Val Ile Ala Gln Val Gly Asn Thr
370 375 380

Gly Glu Ile Ser Arg Ser Ala Leu Tyr Phe Gly Ile Ser Arg Lys Gly
385 390 395 400

Thr Pro Val Asn Pro Ala Gly Trp Val Arg
405 410

<210> 4
<211> 96
<212> PRT
<213> Haemophilus influenzae

5

<400> 4

Val Arg Trp Lys Gly Met Val Ile Gly Ala Ser Ala Gly Thr Pro Val
1 5 10 15

Lys Ala Ile Ala Ala Gly Arg Val Ile Leu Ala Gly Tyr Leu Asn Gly
20 25 30

Tyr Gly Tyr Met Val Ile Val Lys His Gly Glu Thr Asp Leu Ser Leu
35 40 45

Tyr Gly Phe Asn Gln Ala Val Ser Val Lys Val Gly Gln Leu Val Ser
50 55 60

Ala Gly Gln Val Ile Ala Gln Val Gly Asn Thr Gly Glu Ile Ser Arg
65 70 75 80

Ser Ala Leu Tyr Phe Gly Ile Ser Arg Lys Gly Thr Pro Val Asn Pro
85 90 95

<210> 5
<211> 405
<212> PRT
<213> Haemophilus influenzae

10

ES 2 808 659 T3

<400> 5

Met	Lys	Lys	Ser	Phe	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Val	Val	Leu	Ser	1	5	10	15
Ala	Cys	Thr	Ser	Asn	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Ser	Asp	Ala	Asp	Gly	Asn	20	25	30	
Leu	Ser	Pro	Ser	Val	Ile	Gln	Ser	Val	Asn	Gly	Ser	Asn	Val	Gly	Gly	35	40	45	
Ala	Trp	Gln	Pro	Glu	Ile	Gln	Lys	Asn	Ser	Leu	Pro	Thr	Thr	Gly	Asn	50	55	60	
Met	Val	Thr	Pro	Gln	Pro	Asn	Phe	Gln	Pro	Ile	Asn	Gln	Gln	Pro	Thr	65	70	75	80
Met	Pro	Thr	Ala	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala	Phe	Gln	Pro	Ser	Pro	Lys	Thr	85	90	95	
Val	Val	Ser	Ala	Pro	Thr	Val	Gln	Thr	Lys	Thr	Val	Thr	Lys	Thr	Val	100	105	110	
Ala	Asp	Cys	Val	Asp	Gly	Gln	His	Ile	Asn	Ile	Pro	Arg	Asn	Pro	Asn	115	120	125	
Thr	Asn	Val	Pro	Asp	Tyr	Ser	Lys	Ile	Ser	Lys	Gly	Ser	Tyr	Lys	Gly	130	135	140	
Asn	Thr	Tyr	Lys	Val	Asn	Lys	Gly	Asp	Thr	Met	Phe	Leu	Ile	Ala	Tyr	145	150	155	160
Leu	Ala	Gly	Ile	Asp	Val	Lys	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Leu	Ser	165	170	175	
Glu	Pro	Tyr	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Gln	Val	Leu	Lys	Ile	Ser	Asn	Cys	180	185	190	
Ser	Thr	Lys	Thr	Val	Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Val	Lys	Gln	Pro	Ala	Val	195	200	205	
Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Pro	Val	Lys	Pro	Ala	Val	Thr	Tyr	Thr	Pro	210	215	220	
Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile	Gly	Ser	Asp	Gly	Thr	Ile	Ile	Gly	Pro	225	230	235	240
Ile	Lys	Ser	Glu	Ala	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Val	Ala	Thr	Ser	245	250	255	
Ser	Thr	Gln	Val	Thr	Ser	Ser	Val	Asn	Asn	Ala	Asn	Ser	Thr	Pro	Ile	260	265	270	
Asn	Ser	Asn	Val	Val	Ala	Pro	Ile	Ala	Ser	His	Val	Val	Trp	Gln	Trp	275	280	285	
Pro	Thr	Ser	Gly	Asn	Ile	Ile	Gln	Gly	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Gly	Gly	290	295	300	
Asn	Lys	Gly	Ile	Asp	Ile	Ser	Gly	Ser	Arg	Gly	Gln	Ala	Val	Lys	Ala	305	310	315	320
Ala	Ala	Ala	Gly	Arg	Ile	Val	Tyr	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu	Arg	Gly	Tyr	325	330	335	

ES 2 808 659 T3

Gly Asn Leu Ile Ile Ile Lys His Asn Asp Asp Phe Leu Ser Ala Tyr
 340 345 350
 Ala His Asn Asp Lys Ile Leu Val Ala Asp Gln Gln Glu Val Lys Ala
 355 360 365
 Gly Gln Asp Ile Ala Lys Met Gly Ser Ser Gly Thr Asn Thr Val Lys
 370 375 380
 Leu His Phe Glu Ile Arg Tyr Lys Gly Lys Ser Val Asp Pro Val Arg
 385 390 395 400
 Tyr Leu Pro Arg His
 405

<210> 6
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Haemophilus influenzae

5

<400> 6
 Gly Gly Asn Lys Gly Ile Asp Ile Ser Gly Ser Arg Gly Gln Ala Val
 1 5 10 15
 Lys Ala Ala Ala Ala Gly Arg Ile Val Tyr Ala Gly Asn Ala Leu Arg
 20 25 30
 Gly Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Ile Lys His Asn Asp Asp Phe Leu Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Ala His Asn Asp Lys Ile Leu Val Ala Asp Gln Gln Glu Val
 50 55 60
 Lys Ala Gly Gln Asp Ile Ala Lys Met Gly Ser Ser Gly Thr Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Lys Leu His Phe Glu Ile Arg Tyr Lys Gly Lys Ser Val Asp Pro
 85 90 95

<210> 7
 <211> **440**
 <212> **PRT**
 <213> Escherichia coli

10

<400> 7

ES 2 808 659 T3

Met	Gln	Gln	Ile	Ala	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Phe	Asn	Asn	Leu	Pro
1				5					10					15	
Arg	Pro	His	Arg	Val	Met	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Val	Leu	Thr	Leu	Ala
			20					25					30		
Val	Ala	Val	Trp	Arg	Pro	Tyr	Val	Tyr	His	Arg	Asp	Ala	Thr	Pro	Ile
		35					40					45			
Val	Lys	Thr	Ile	Glu	Leu	Glu	Gln	Asn	Glu	Ile	Arg	Ser	Leu	Leu	Pro
	50						55				60				
Glu	Ala	Ser	Glu	Pro	Ile	Asp	Gln	Ala	Ala	Gln	Glu	Asp	Glu	Ala	Ile
65					70					75					80
Pro	Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	Asp	Lys	Ile	Ala	Gly	Glu	Ala	Gly	Val	His
				85					90					95	

Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Thr	Gly	Asp	Thr	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Asn	Gln	
			100					105					110			
Tyr	Gly	Ile	Asp	Met	Gly	Asp	Ile	Thr	Gln	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys	
		115					120					125				
Glu	Leu	Arg	Asn	Leu	Lys	Ile	Gly	Gln	Gln	Leu	Ser	Trp	Thr	Leu	Thr	
	130					135					140					
Ala	Asp	Gly	Glu	Leu	Gln	Arg	Leu	Thr	Trp	Glu	Val	Ser	Arg	Arg	Glu	
145					150					155					160	
Thr	Arg	Thr	Tyr	Asp	Arg	Thr	Ala	Ala	Asn	Gly	Phe	Lys	Met	Thr	Ser	
				165					170					175		
Glu	Met	Gln	Gln	Gly	Glu	Trp	Val	Asn	Asn	Leu	Leu	Lys	Gly	Thr	Val	
			180					185					190			
Gly	Gly	Ser	Phe	Val	Ala	Ser	Ala	Arg	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	Ser	Ala	
		195					200					205				
Glu	Val	Ser	Ala	Val	Ile	Lys	Ala	Met	Gln	Trp	Gln	Met	Asp	Phe	Arg	
	210					215					220					
Lys	Leu	Lys	Lys	Gly	Asp	Glu	Phe	Ala	Val	Leu	Met	Ser	Arg	Glu	Met	
225					230					235					240	
Leu	Asp	Gly	Lys	Arg	Glu	Gln	Ser	Gln	Leu	Leu	Gly	Val	Arg	Leu	Arg	
				245					250					255		
Ser	Glu	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Arg	Ala	Glu	Asp	Gly	Lys	Phe	
			260					265					270			
Tyr	Asp	Arg	Asn	Gly	Thr	Gly	Leu	Ala	Lys	Gly	Phe	Leu	Arg	Phe	Pro	
		275					280					285				
Thr	Ala	Lys	Gln	Phe	Arg	Ile	Ser	Ser	Asn	Phe	Asn	Pro	Arg	Arg	Thr	
	290					295					300					
Asn	Pro	Val	Thr	Gly	Arg	Val	Ala	Pro	His	Arg	Gly	Val	Asp	Phe	Ala	
305					310					315					320	
Met	Pro	Gln	Gly	Thr	Pro	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Asp	Gly	Glu	Val	Val	
				325					330					335		
Val	Ala	Lys	Arg	Ser	Gly	Ala	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Val	Ala	Ile	Arg	His	
			340					345					350			
Gly	Arg	Ser	Tyr	Thr	Thr	Arg	Tyr	Met	His	Leu	Arg	Lys	Ile	Leu	Val	
		355					360					365				
Lys	Pro	Gly	Gln	Lys	Val	Lys	Arg	Gly	Asp	Arg	Ile	Ala	Leu	Ser	Gly	
	370					375					380					
Asn	Thr	Gly	Arg	Ser	Thr	Gly	Pro	His	Leu	His	Tyr	Glu	Val	Trp	Ile	
385					390					395					400	
Asn	Gln	Gln	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Pro	Arg	Thr	Glu	
				405					410					415		
Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Asp	Arg	Arg	Glu	Phe	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys	Glu	
			420					425					430			

ES 2 808 659 T3

Ile Val Pro Gln Leu Arg Phe Asp
435 440

<210> 8
<211> 95
<212> **PRT**
<213> Escherichia coli

5

<400> 8

Pro	His	Arg	Gly	Val	Asp	Phe	Ala	Met	Pro	Gln	Gly	Thr	Pro	Val	Leu
1				5					10					15	
Ser	Val	Gly	Asp	Gly	Glu	Val	Val	Val	Ala	Lys	Arg	Ser	Gly	Ala	Ala
			20					25					30		
Gly	Tyr	Tyr	Val	Ala	Ile	Arg	His	Gly	Arg	Ser	Tyr	Thr	Thr	Arg	Tyr
		35					40						45		
Met	His	Leu	Arg	Lys	Ile	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gln	Lys	Val	Lys	Arg
	50					55					60				
Gly	Asp	Arg	Ile	Ala	Leu	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Arg	Ser	Thr	Gly	Pro
65					70					75					80
His	Leu	His	Tyr	Glu	Val	Trp	Ile	Asn	Gln	Gln	Ala	Val	Asn	Pro	
				85					90					95	

<210> 9
<211> 419
<212> **PRT**
<213> Escherichia coli

10

<400> 9

ES 2 808 659 T3

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

ES 2 808 659 T3

Glu	Thr	Ile	Ala	Gln	Leu	Lys	Gln	Thr	Arg	Glu	Glu	Val	Ala	Met	Gln	
				165					170					175		
Arg	Ala	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Gln	Ser	Glu	Gln	Gln	Thr	Leu	Leu	Tyr	
				180					185					190		
Glu	Gln	Arg	Ala	Gln	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Asn	Glu	Arg	
				195					200					205		
Lys	Lys	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Ser	Ile	Gln	Gln	Gly	Gln	Gln	
				210					215					220		
Gln	Leu	Ser	Glu	Leu	Arg	Ala	Asn	Glu	Ser	Arg	Leu	Arg	Asn	Ser	Ile	
				225					230					235		
Ala	Arg	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Ala	Arg	
				245					250					255		
Glu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Asp	Arg	Gln	Lys	Glu	Ala	Thr	Arg	Lys	Gly	
				260					265					270		
Thr	Thr	Tyr	Lys	Pro	Thr	Glu	Ser	Glu	Lys	Ser	Leu	Met	Ser	Arg	Thr	
				275					280					285		
Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Arg	Gly	Gln	Ala	Phe	Trp	Pro	Val	Arg	Gly	
				290					295					300		
Pro	Thr	Leu	His	Arg	Tyr	Gly	Glu	Gln	Leu	Gln	Gly	Glu	Leu	Arg	Trp	
				305					310					315		
Lys	Gly	Met	Val	Ile	Gly	Ala	Ser	Glu	Gly	Thr	Glu	Val	Lys	Ala	Ile	
				325					330					335		
Ala	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Leu	Ala	Asp	Trp	Leu	Gln	Gly	Tyr	Gly	Leu	
				340					345					350		
Val	Val	Val	Val	Glu	His	Gly	Lys	Gly	Asp	Met	Ser	Leu	Tyr	Gly	Tyr	
				355					360					365		
Asn	Gln	Ser	Ala	Leu	Val	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Val	Arg	Ala	Gly	Gln	
				370					375					380		
Pro	Ile	Ala	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Gly	Arg	Pro	Ser	Leu	
				385					390					395		
Tyr	Phe	Glu	Ile	Arg	Arg	Gln	Gly	Gln	Ala	Val	Asn	Pro	Gln	Pro	Trp	
				405					410					415		
Leu	Gly	Arg														

<210> 10
<211> 96
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<400> 10

ES 2 808 659 T3

Leu	Arg	Trp	Lys	Gly	Met	Val	Ile	Gly	Ala	Ser	Glu	Gly	Thr	Glu	Val
1				5					10					15	
Lys	Ala	Ile	Ala	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Leu	Ala	Asp	Trp	Leu	Gln	Gly
			20					25					30		
Tyr	Gly	Leu	Val	Val	Val	Val	Glu	His	Gly	Lys	Gly	Asp	Met	Ser	Leu
		35					40					45			
Tyr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Ser	Ala	Leu	Val	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Val	Arg
		50				55					60				
Ala	Gly	Gln	Pro	Ile	Ala	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Gly	Arg
65					70					75					80
Pro	Ser	Leu	Tyr	Phe	Glu	Ile	Arg	Arg	Gln	Gly	Gln	Ala	Val	Asn	Pro
				85					90					95	

<210> 11
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 11

5

ES 2 808 659 T3

Met	Ser	Ala	Gly	Ser	Pro	Lys	Phe	Thr	Val	Arg	Arg	Ile	Ala	Ala	Leu	1	5	10	15
Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Trp	Leu	Ala	Gly	Cys	Ser	Asp	Thr	Ser	Asn	Pro	20	25	30	
Pro	Ala	Pro	Val	Ser	Ser	Val	Asn	Gly	Asn	Ala	Pro	Ala	Asn	Thr	Asn	35	40	45	
Ser	Gly	Met	Leu	Ile	Thr	Pro	Pro	Pro	Lys	Met	Gly	Thr	Thr	Ser	Thr	50	55	60	
Ala	Gln	Gln	Pro	Gln	Ile	Gln	Pro	Val	Gln	Gln	Pro	Gln	Ile	Gln	Ala	65	70	75	80
Thr	Gln	Gln	Pro	Gln	Ile	Gln	Pro	Val	Gln	Pro	Val	Ala	Gln	Gln	Pro	85	90	95	
Val	Gln	Met	Glu	Asn	Gly	Arg	Ile	Val	Tyr	Asn	Arg	Gln	Tyr	Gly	Asn	100	105	110	
Ile	Pro	Lys	Gly	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Thr	Val	Lys	Lys	Gly	115	120	125	
Asp	Thr	Leu	Phe	Tyr	Ile	Ala	Trp	Ile	Thr	Gly	Asn	Asp	Phe	Arg	Asp	130	135	140	
Leu	Ala	Gln	Arg	Asn	Asn	Ile	Gln	Ala	Pro	Tyr	Ala	Leu	Asn	Val	Gly	145	150	155	160
Gln	Thr	Leu	Gln	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Ile	Thr	Gly	Gly	165	170	175	
Asn	Ala	Ile	Thr	Gln	Ala	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Gly	Val	Val	Ile	Lys	180	185	190	
Pro	Ala	Gln	Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Val	Ala	Ser	Gln	Pro	Thr	Ile	Thr	195	200	205	
Tyr	Ser	Glu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gln	Ser	Ala	Asn	Lys	Met	Leu	Pro	Asn	210	215	220	
Asn	Lys	Pro	Thr	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Ala	Pro	Val	Thr	Val	Pro	Thr	225	230	235	240

Ala Ser Thr Thr Glu Pro Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Pro
245 250 255

Ile Ser Thr Trp Arg Trp Pro Thr Glu Gly Lys Val Ile Glu Thr Phe
260 265 270

Gly Ala Ser Glu Gly Gly Asn Lys Gly Ile Asp Ile Ala Gly Ser Lys
275 280 285

Gly Gln Ala Ile Ile Ala Thr Ala Asp Gly Arg Val Val Tyr Ala Gly
290 295 300

Asn Ala Leu Arg Gly Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Ile Lys His Asn Asp
305 310 315 320

Asp Tyr Leu Ser Ala Tyr Ala His Asn Asp Thr Met Leu Val Arg Glu
325 330 335

Gln Gln Glu Val Lys Ala Gly Gln Lys Ile Ala Thr Met Gly Ser Thr
340 345 350

Gly Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Phe Glu Ile Arg Tyr Lys Gly Lys
355 360 365

Ser Val Asn Pro Leu Arg Tyr Leu Pro Gln Arg
370 375

<210> 12
<211> 96
<212> PRT
<213> Escherichia coli

5

<400> 12

Gly Gly Asn Lys Gly Ile Asp Ile Ala Gly Ser Lys Gly Gln Ala Ile
1 5 10 15

Ile Ala Thr Ala Asp Gly Arg Val Val Tyr Ala Gly Asn Ala Leu Arg
20 25 30

Gly Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Ile Lys His Asn Asp Asp Tyr Leu Ser
35 40 45

Ala Tyr Ala His Asn Asp Thr Met Leu Val Arg Glu Gln Gln Glu Val
50 55 60

Lys Ala Gly Gln Lys Ile Ala Thr Met Gly Ser Thr Gly Thr Ser Ser
65 70 75 80

Thr Arg Leu His Phe Glu Ile Arg Tyr Lys Gly Lys Ser Val Asn Pro
85 90 95

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> dominio LytM

<220>
<221> misc_feature
<222> 2, 3, 4

15

<223> 'Xaa' es cualquier aminoácido

<400> 13

His Xaa Xaa Xaa Asp
1 5

5

<210> 14

<211> 5

<212> **PRT**

<213> Secuencia **artificial**

<220>

<223> dominio LytM

10

<400> **14**

His Lys Gly Val Asp
1 5

<210> 15

<211> 5

<212> **PRT**

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio LytM

<400> 15

His Arg Gly Val Asp
1 5

20

<210> 16

<211> 5

<212> **PRT**

<213> Secuencia **artificial**

<220>

25

<223> dominio LytM

<400> 16

His Thr Gly Ile Asp
1 5

30

<210> 17

<211> 5

<212> **PRT**

<213> Secuencia **artificial**

<220>

<223> motivo LytM

<400> 17

Asn Lys Gly Val Asp
1 5

35

<210> 18

<211> 5

<212> **PRT**

<213> Secuencia **artificial**

40

<220>

<223> motivo LytM

<400> 18		
		Thr Lys Gly Ile Asp
		1 5
5	<210> 19 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> motivo LytM	
	<400> 19	
10		Asn Lys Gly Ile Asp
		1 5
	<210> 20 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> motivo LytM	
	<400> 20	
		Trp Lys Gly Val Phe
		1 5
20	<210> 21 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> motivo LytM	
25	<400> 21	
		Trp Arg Gly Leu Val
		1 5
30	<210> 22 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> motivo LytM	
	<400> 22	
		Trp Lys Gly Met Val
		1 5
35	<210> 23 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> oligodesoxinucleótido inmunoestimulador	
	<220>	

<221> base_modificada
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25
 <223> 'n' es 'i' (Inosina)

5 <400> 23
 ncnncncnc ncnncncnc ncnncnc 26

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido antimicrobiano

<400> 24

	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	Lys
	1				5					10	

15 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

20 <400> 25
 ttgcacgcgc caataatacc 20

<210> 26
 <211> 29
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 26
 tgcattgcatt tacgtgttc actggcatt 29

30 <210> 27
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

<400> 27
 tgcattgcatt gttcgtgttc gtgaagcag 29

40 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

45 <400> 28
 aacgcgattg cgtaatgcag 20

<210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

 <400> 29
 tgctggtgca attgatctt c 21
 5 <210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 <400> 30
 tgcatgcatt gattaacgcc aaaacgcaac 30

 15 <210> 31
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 20 <400> 31
 tgcatgcata ttagccgtaa aggaacgcc 29

 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 32
 tggcgatcta atgaacgcac 20

 30 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 33
 aaacattgtg caacaatggg g 21

 <210> 34
 <211> 30
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 34
 tgcatgcata caagactcaa agggagtaag 30

 45 <210> 35
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Cebador

	<400> 35	
	tgcatgcatg gatccagtag gttacctac 29	
	<210> 36	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 36	
10	gtttctttgt ccgcaggttc 20	
	<210> 37	
	<211> 1248	
	<212> ADN	
	<213> Neisseria meningitidis	
15	<400> 37	
	atgttgaaac aaacgacact tttggcagct tgtaccgccg ttgccgctct gttgggagggt 60	
	tgccgccacc aacagcctgc tcctgtcatt gcaggcaatt caggtatgca ggacgcgccg 120	
	tcttcggcag tttacaacaa cccctatgga gcaacgccgt acagcccggc tcctgccggc 180	
	gatgcgcctt atgtgccgcc ggtgcaaagc gcgcgggttt atacgcctcc tgcttatgtt 240	
	ccgcgcgtct cacctgccgt ttcgggtaca tacgttcctt cttacgcacc cgtcgacatc 300	
	aacgcggcga cgcatactat tgtgcgcggc gacacgggtg acaacatttc caaacgctac 360	
	catatctctc aagacgattt ccgtgcgtgg aacggcatga ccgacaatac gttgagcatc 420	
	ggtcagattg ttaaagtcaa accggcagga tatgccgcac cgaaagccgc agccgtaaaa 480	
	agcaggcccc ccgtaccggc tgccgcgcaa ccgcccgtac agtccgcacc cgtcgacatt 540	
	aacgcggcga cgcatactat tgtgcgcggc gacacgggtg acaacatttc caaacgctac 600	
	catatctctc aagacgattt ccgtgcgtgg aacggcatga ccgacaatat gttgagcatc 660	
	ggtcagattg ttaaagtcaa accggcagga tatgccgcac cgaaaaccgc agccgtagaa 720	
	agcaggcccc ccgtaccggc tgccgtgcaa acccctgtga aaccgcgccg gcaaccgcct 780	
	gtgcagtcgc cgcgcgaacc tgccgcgccc gctgcggaaa ataaagcggg tcccgcgccc 840	
	gccccgcaat ctcttgccgc ttgcgccttc ggcacgcgtt cggtcggcgg cattgttttg 900	
	cagcgtccga cgcaaggtaa agtggttgcc gatttcggcg gcaacaacaa ggggtgtcgat 960	
	attgccggta atgcgggaca gcccgttttg gcggcggctg acggcaaagt ggtttatgcc 1020	
	ggttcagggt tgaggggata cggaaacttg gtcacatcc agcataattc ttctttcctg 1080	
	accgcatacg ggcacaacca aaaattgctg gtcggcgagg ggcagcagg caaacgcggg 1140	
	cagcaggttg ctttgatggg caataccgat gcttcagaa cgcagcttca tttcgagggtg 1200	
	cgtcaaaacg gcaaaccggg taaccggaac agctatatcg cgttctga 1248	
	<210> 38	
	<211> 1293	
	<212> ADN	
20	<213> Neisseria meningitidis	
	<400> 38	

ES 2 808 659 T3

atggctgtct	tcccactttc	ggcaaaacat	cggaataacg	cgctgcgtgc	gcttgccgtt	60
tcgattat	tggtgtcggc	ggcatacatt	gcttcgacag	agaggacgga	gcgcgtcaga	120
ccgcagcgcg	tggaacaaaa	tctgccgccg	ctgtcttggg	gcggcagcgg	cgttcagacg	180
gcatattggg	tgcaaggaggc	ggtgcagccg	ggcgactcgc	tggcggacgt	gctggcgcgt	240
tcgggtatgg	cgcgggacga	gattgcccgga	atcacggaaa	aatatggcgg	cgaagccgat	300
ttgcggcatt	tgcgtgccga	ccagtcgggt	catgttttgg	tcggcggcga	cggcggcgcg	360
cgcgaagtgc	agttttttac	cgacgaagac	ggcgagcgca	atctggtcgc	tttggaagag	420
aaaggcggca	tatggcggcg	gtcggcttct	gaggcggata	tgaaggtttt	gccgacgctg	480

cgttcggtcg	tggtcaaaac	gtcggcgcgc	ggttcgctgg	cgcgggcgga	agtgcccgtc	540
gaaatccgcg	aatccttaag	cgggattttc	gccggccgct	tcagccttga	cggtttgaag	600
gaaggcgatg	ccgtgcgcct	gatgtacgac	agcctgtatt	tccacgggca	gcaggtggcg	660
gcgggcgata	ttttggcggc	tgaagtgcgt	aagggcggca	caaggcatca	ggcgttctat	720
taccgttcgg	acaaggaagg	cggagggggc	ggcaattatt	atgatgaaga	cggcaagggtg	780
ttgcaggaaa	aaggcggcct	caacatcgag	ccgctgggtc	atacgcgcat	ttcttcgccg	840
ttcggctacc	gtatgcaccc	catcctgcac	acatggcggc	tgcacacggg	catcgattat	900
gccgcaccgc	agggaaacgc	ggtcaggggt	tccgccgacg	gcgtgattac	ctttaaaaggc	960
cggaagggcg	gatacggcaa	cgcggtgatg	atacgcacag	ccaacggtgt	ggaaacgctg	1020
tacgcgcact	tgagcgcgtt	ttcgcaggcg	gaaggcaatg	tgcgcggcgg	cgaggtcatc	1080
ggttttgtcg	gttcgaccgg	gcgttcgacc	gggccgcacc	tgcattacga	ggcgcgcac	1140
aacgggcagc	ccgtcaatcc	tgtttcgggt	gcattgccga	caccggaatt	gacgcaggcg	1200
gacaaggcgg	cgtttgccgc	gcagaaacag	aaggcggacg	cgctgcttgc	gcgcttgccg	1260
ggcataccgg	ttaccgtgtc	gcaatcggat	tga			1293

<210> 39

<211> 1791

<212> **ADN**

<213> Neisseria meningitidis

5

<400> 39

```

atgcgctaca aaccccttct gcttgccttg atgctcgttt tttccacgcc cgccgttgcc 60
gccacgacg cggcacacaa ccgttccgcc gaagtgaata aacagacgaa gaacaaaaaa 120
gaacagcccg aagcggcgga aggcaaaaaa gaaaaaggca aaaatggcgc agtgaaagat 180
aaaaaacag gcggcaaaga ggcggaaaaa gagggcaaa agtccaaaaa aaccgccaaa 240
aaccgcaaag aagcagagaa ggaggcgaca tccaggcagt ctgcgcgcaa aggacgcgaa 300
ggggataaga aatcgaaagg ggaacacaaa aaggcacatg gcaagcccgt gtccggatcc 360
aaagaaaaaa acgcaaaaac acagcctgaa aacaaacaag gcaaaaaaga ggcaaaagga 420
cagggcaatc cgcgcaaggg cggcaaggcg gaaaaagaca ctgtttctgc aaataaaaaa 480
gtccgttccg acaagaacgg caaagcagtg aaacaggaca aaaaatacag ggaagagaaa 540
aatgccaaaa ccgattccga cgaattgaaa gccgccgttg ccgctgccac caatgatgtc 600
gaaaaacaaa aagccctgct caaacaaagc gaaggaatgc tgcttcattg gcaaatcc 660
ctcaaacagc ttcaggaaga gcgtatccgc caagagcgtg tccgtcaggc gcgcggcaac 720
cttgcttccg tcaaccgcaa acagcgcgag gcttgggaca agttccaaaa actcaatacc 780
gagctgaacc gtttgaaaac ggaagtcgcc gctacgaaag cgcagatttc ccgtttcgta 840
tcggggaact ataaaaacag ccagccgaat gcggttgccc tgctcctgaa aaacgccgaa 900
ccgggtcaga aaaaccgctt tttgcgttat acgcgttatg taaacgcctc caatcgggaa 960
gttgtcaagg atttgaaaaa acagcagaag gctttggcgg tacaagagca gaaaatcaac 1020
aatgagcttg cccgtttgaa gaaaattcag gcaaacgtgc aatctctgct gaaaaaacag 1080
ggtgtaaccg atgcggcgga acagacggaa agccgcagac agaatgcaa aatcgccaaa 1140
gatgcccga aactgctgga acagaaaagg aacgagcagc agctgaacaa gctcttgagc 1200
aatttgga gaaaaaagg cgaacaccgc attcaggatg cggaagcaaa aagaaaattg 1260
gctgaagcca gactggcggc agccgaaaaa gccagaaaag aagcggcgca gcagaaggct 1320
gaagcacgac gtgcggaaat gtccaacctg accgccgaag acaggaacat ccaagcgctt 1380
tcggttatgg gtatcggcag tgccgacggg ttacagccga tgcaaggacg tttgaaaaaa 1440
ccggttgacg gtgtgccgac cggacttttc gggcagaacc ggagcggcgg cgatatattg 1500
aaaggcgtgt tctattccac tgcaccggca acggttgaaa gcattgcgcc gggaacggta 1560
agctatgcgg acgagttgga cggctacggc aaagtggctg tggtcgatca cggcgagaa 1620
tacatcagca tctatgccgg tttgagcgaa atttccgtcg gcaagggtta tatggtcgcg 1680
gcaggaagca aaatcggctc gagcgggtcg ctgccggacg gggaagaggg gctttacctg 1740
caaatacgtt atcaaggtca ggtattgaac cttcgcagct ggatacgttg a 1791

```

<210> 40

<211> 415

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 40

```

Met Leu Lys Gln Thr Thr Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ala Val Ala Ala
1           5           10           15

```

```

Leu Leu Gly Gly Cys Ala Thr Gln Gln Pro Ala Pro Val Ile Ala Gly
20           25           30

```

ES 2 808 659 T3

Asn	Ser	Gly	Met	Gln	Asp	Ala	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Tyr	Asn	Asn	Pro		
		35					40					45					
Tyr	Gly	Ala	Thr	Pro	Tyr	Ser	Pro	Ala	Pro	Ala	Gly	Asp	Ala	Pro	Tyr		
	50					55					60						
Val	Pro	Pro	Val	Gln	Ser	Ala	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr	Val		
65					70					75					80		
Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Ser	Gly	Thr	Tyr	Val	Pro	Ser	Tyr	Ala		
				85					90					95			
Pro	Val	Asp	Ile	Asn	Ala	Ala	Thr	His	Thr	Ile	Val	Arg	Gly	Asp	Thr		
			100					105					110				
Val	Tyr	Asn	Ile	Ser	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ser	Gln	Asp	Asp	Phe	Arg		
		115					120					125					
Ala	Trp	Asn	Gly	Met	Thr	Asp	Asn	Thr	Leu	Ser	Ile	Gly	Gln	Ile	Val		
	130					135						140					
Lys	Val	Lys	Pro	Ala	Gly	Tyr	Ala	Ala	Pro	Lys	Ala	Ala	Ala	Val	Lys		
145					150					155					160		
Ser	Arg	Pro	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Ala	Gln	Pro	Pro	Val	Gln	Ser	Ala		
				165					170					175			
Pro	Val	Asp	Ile	Asn	Ala	Ala	Thr	His	Thr	Ile	Val	Arg	Gly	Asp	Thr		
			180					185					190				
Val	Tyr	Asn	Ile	Ser	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ser	Gln	Asp	Asp	Phe	Arg		
		195					200					205					
Ala	Trp	Asn	Gly	Met	Thr	Asp	Asn	Met	Leu	Ser	Ile	Gly	Gln	Ile	Val		
	210					215					220						
Lys	Val	Lys	Pro	Ala	Gly	Tyr	Ala	Ala	Pro	Lys	Thr	Ala	Ala	Val	Glu		
225					230					235					240		
Ser	Arg	Pro	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Val	Gln	Thr	Pro	Val	Lys	Pro	Ala		
				245					250					255			
Ala	Gln	Pro	Pro	Val	Gln	Ser	Ala	Pro	Gln	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala		
			260					265					270				
Glu	Asn	Lys	Ala	Val	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Gln	Ser	Pro	Ala	Ala	Ser		
		275				280						285					
Pro	Ser	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Gly	Gly	Ile	Val	Trp	Gln	Arg	Pro	Thr		
		290				295					300						
Gln	Gly	Lys	Val	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Asn	Asn	Lys	Gly	Val	Asp		
305					310					315					320		
Ile	Ala	Gly	Asn	Ala	Gly	Gln	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Gly	Lys		
				325					330					335			
Val	Val	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly	Leu	Arg	Gly	Tyr	Gly	Asn	Leu	Val	Ile		
			340					345					350				
Ile	Gln	His	Asn	Ser	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Tyr	Gly	His	Asn	Gln	Lys		
		355					360					365					

ES 2 808 659 T3

Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Gly	Gln	Gln	Val	Lys	Arg	Gly	Gln	Gln	Val	Ala
370						375					380				
Leu	Met	Gly	Asn	Thr	Asp	Ala	Ser	Arg	Thr	Gln	Leu	His	Phe	Glu	Val
385					390					395					400
Arg	Gln	Asn	Gly	Lys	Pro	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Tyr	Ile	Ala	Phe	
				405					410					415	

<210> 41

<211> 430

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 41

ES 2 808 659 T3

Met	Ala	Val	Phe	Pro	Leu	Ser	Ala	Lys	His	Arg	Lys	Tyr	Ala	Leu	Arg	1	5	10	15
Ala	Leu	Ala	Val	Ser	Ile	Ile	Leu	Val	Ser	Ala	Ala	Tyr	Ile	Ala	Ser	20	25	30	
Thr	Glu	Arg	Thr	Glu	Arg	Val	Arg	Pro	Gln	Arg	Val	Glu	Gln	Asn	Leu	35	40	45	
Pro	Pro	Leu	Ser	Trp	Gly	Gly	Ser	Gly	Val	Gln	Thr	Ala	Tyr	Trp	Val	50	55	60	
Gln	Glu	Ala	Val	Gln	Pro	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Asp	Val	Leu	Ala	Arg	65	70	75	80
Ser	Gly	Met	Ala	Arg	Asp	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Thr	Glu	Lys	Tyr	Gly	85	90	95	
Gly	Glu	Ala	Asp	Leu	Arg	His	Leu	Arg	Ala	Asp	Gln	Ser	Val	His	Val	100	105	110	
Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Gly	Gly	Ala	Arg	Glu	Val	Gln	Phe	Phe	Thr	Asp	115	120	125	
Glu	Asp	Gly	Glu	Arg	Asn	Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Lys	Lys	Gly	Gly	Ile	130	135	140	
Trp	Arg	Arg	Ser	Ala	Ser	Glu	Ala	Asp	Met	Lys	Val	Leu	Pro	Thr	Leu	145	150	155	160
Arg	Ser	Val	Val	Val	Lys	Thr	Ser	Ala	Arg	Gly	Ser	Leu	Ala	Arg	Ala	165	170	175	
Glu	Val	Pro	Val	Glu	Ile	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	Gly	Ile	Phe	Ala	Gly	180	185	190	
Arg	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Gly	Asp	Ala	Val	Arg	Leu	Met	195	200	205	
Tyr	Asp	Ser	Leu	Tyr	Phe	His	Gly	Gln	Gln	Val	Ala	Ala	Gly	Asp	Ile	210	215	220	
Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	His	Gln	Ala	Phe	Tyr	225	230	235	240
Tyr	Arg	Ser	Asp	Lys	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Glu	245	250	255	

ES 2 808 659 T3

Asp	Gly	Lys	Val	Leu	Gln	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Asn	Ile	Glu	Pro	Leu	260	265	270
Val	Tyr	Thr	Arg	Ile	Ser	Ser	Pro	Phe	Gly	Tyr	Arg	Met	His	Pro	Ile	275	280	285
Leu	His	Thr	Trp	Arg	Leu	His	Thr	Gly	Ile	Asp	Tyr	Ala	Ala	Pro	Gln	290	295	300
Gly	Thr	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Ala	Asp	Gly	Val	Ile	Thr	Phe	Lys	Gly	305	310	315
Arg	Lys	Gly	Gly	Tyr	Gly	Asn	Ala	Val	Met	Ile	Arg	His	Ala	Asn	Gly	325	330	335
Val	Glu	Thr	Leu	Tyr	Ala	His	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser	Gln	Ala	Glu	Gly	340	345	350
Asn	Val	Arg	Gly	Gly	Glu	Val	Ile	Gly	Phe	Val	Gly	Ser	Thr	Gly	Arg	355	360	365
Ser	Thr	Gly	Pro	His	Leu	His	Tyr	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Gly	Gln	Pro	370	375	380
Val	Asn	Pro	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Thr	Pro	Glu	Leu	Thr	Gln	Ala	385	390	395
Asp	Lys	Ala	Ala	Phe	Ala	Ala	Gln	Lys	Gln	Lys	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	405	410	415
Ala	Arg	Leu	Arg	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Gln	Ser	Asp			420	425	430

<210> 42

<211> 297

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

5

<400> 42

ES 2 808 659 T3

Glu	Pro	Gly	Gln	Lys	Asn	Arg	Phe	Leu	Arg	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Val	Asn	1	5	10	15
Ala	Ser	Asn	Arg	Glu	Val	Val	Lys	Asp	Leu	Glu	Lys	Gln	Gln	Lys	Ala	20	25	30	
Leu	Ala	Val	Gln	Glu	Gln	Lys	Ile	Asn	Asn	Glu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	35	40	45	
Lys	Ile	Gln	Ala	Asn	Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Lys	Gln	Gly	Val	Thr	50	55	60	
Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	Glu	Ser	Arg	Arg	Gln	Asn	Ala	Lys	Ile	Ala	65	70	75	80
Lys	Asp	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu	Glu	Gln	Lys	Gly	Asn	Glu	Gln	Gln	Leu	85	90	95	
Asn	Lys	Leu	Leu	Ser	Asn	Leu	Glu	Lys	Lys	Lys	Ala	Glu	His	Arg	Ile	100	105	110	
Gln	Asp	Ala	Glu	Ala	Lys	Arg	Lys	Leu	Ala	Glu	Ala	Arg	Leu	Ala	Ala	115	120	125	
Ala	Glu	Lys	Ala	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Gln	Gln	Lys	Ala	Glu	Ala	Arg	130	135	140	
Arg	Ala	Glu	Met	Ser	Asn	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Arg	Asn	Ile	Gln	Ala	145	150	155	160
Pro	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Phe	Ser	Arg	Met	Gln	165	170	175	
Gly	Arg	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Thr	Gly	Leu	Phe	Gly	180	185	190	
Gln	Asn	Arg	Ser	Gly	Gly	Asp	Ile	Trp	Lys	Gly	Val	Phe	Tyr	Ser	Thr	195	200	205	
Ala	Pro	Ala	Thr	Val	Glu	Ser	Ile	Ala	Pro	Gly	Thr	Val	Ser	Tyr	Ala	210	215	220	
Asp	Glu	Leu	Asp	Gly	Tyr	Gly	Lys	Val	Val	Val	Val	Asp	His	Gly	Glu	225	230	235	240
Asn	Tyr	Ile	Ser	Ile	Tyr	Ala	Gly	Leu	Ser	Glu	Ile	Ser	Val	Gly	Lys	245	250	255	
Gly	Tyr	Met	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	260	265	270	
Pro	Asp	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Gln	Ile	Arg	Tyr	Gln	Gly	Gln	275	280	285	
Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Ser	Trp	Ile	Arg	290	295									

<210> 43
 <211> 29
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 43
5 gctctagacg ttacagcggc aattattgc 29

<210> 44
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 44
tcccccgggc gcagacagta cagatagtag 30

15 <210> 45
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 45
tcccccgga tgttcgata tatagcctg 29

<210> 46
<211> 28
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 46
ccgctcgacc cctattttgt ggaacatc 28

30 <210> 47
<211> 885
<212> ADN
<213> Bordetella pertussis

<400> 47

atgctcaacg	ggcagttgca	actgaccgaa	tcccaatccg	tggctggcgc	atccgcccgc	60
gccgcttccc	gccccgttct	ctgggcgggc	gtgctggcca	tcgccttgct	ggccggctgc	120
gcctcgaagg	gccccgcgcg	gcctgtggtc	gacctcaccg	gacagcccgg	cgcctccggc	180
ccgaccgacg	gcagctatgt	cgtcaagcct	ggcgatacgc	tctacaagat	cgcgcgcgcc	240
aacaatgtcg	atatcgaaaa	cctcaagcgc	tggacaacc	tcaccgatcc	caaccagatc	300
agtgtcggcc	aggtgctgcg	cctgtcgagc	tcgggcgcgc	gcggcgcgca	gaccacgccc	360
gtgacctcct	ccaagccgca	acccaagccg	ctggaccagg	gaagcgcgca	aacgcccggc	420
ggcggcatgg	aagccggcgc	cggcggcgaa	accggcgggg	ccaccacccc	gccccgggca	480
acggtgcccg	atccccagcc	cgcgcgcgcg	gccgatgccg	ccgtcatcaa	ctggggctgg	540
ccggccaatg	gcgccatcct	gcagaccttc	aacagcaaca	ccaaggccat	cgacctggcc	600
ggctcgctgg	gcgatccggc	gatcgcggcg	gccgatggca	aggtgatgta	cagcggcaat	660
ggcgtgcgcg	gcctgggcaa	cctgatcacc	agaacggctt	catcacggcc		720
tacgcgcaca	accgcgcgct	gctgggtcaag	accggccaga	acgtcaagcg	cggggccaag	780
atcgccgaga	tcggcgagac	cgacaccacg	tcgccgcggc	tgcatttcga	gatccgcccgc	840
cagggcacgc	cggtcgaccc	gatgcagtat	ctgccgcgcg	gatga		885

35 <210> 48
<211> 1416
<212> **ADN**

<213> Bordetella pertussis

<400> 48

atgaatcgtg	gccccaacag	tttgggtg	gcgc	agcttcaa	ac	gcaaagttgc	cgccctgttc	60
gccccctcctg	tcgaacctac	ctcgcgtggc	ggcgccctgc	tccgcccgcac	cctgacagtc		120	
tccgcgctcg	gcctgttcgc	cggcgccgcc	gcgctgggca	tggttcaaca	gcccgaccgc		180	
tccgaacttc	cccccttg	cgc	gatcgac	agcgtcctgc	cgctcgaggc	gggcccagatg	240	
caggtcagcg	acgccagcaa	cgccccctat	atcagcgaaa	cccgcacccg	cgccggcgac		300	
accctggccg	ccgtgctgca	gcgcctggac	atcgacagcc	cgcggtgca	gaacttcctg		360	
accacagcag	ccagcgcgcg	cagcatctac	aagctgtacc	cgggccgctc	ggtacaggcc		420	
gccaccaacg	agaacggcga	cctgggtctg	ctgcgctaca	tccacacccc	cggcaacgaa		480	
tccggcgggc	aggtggtcac	gcggctgctg	cacgtggcgc	ccgacggcgc	caacggctac		540	
aaggccgagc	aagtcaccca	gggcaccgaa	caacagaccc	gcgtcgcggt	cggcaccatc		600	
cgctcctcgc	tggtcgggtg	caccgacgcg	gcgggcatcc	ccgactcggg	caccatgcag		660	
atggccgaca	tcctcagctc	caagatcgac	ttcctgcgcg	acctgcgcca	gggcgaccag		720	
ttccgcgtgg	tgtacgaggt	ccgcacccac	gaaggccgct	atgcgggcgc	cgggcgcgtg		780	
caggcgctgg	aattcatcaa	cggcgacaag	acctacaacg	ccgtctgggt	cagcccggac		840	
ggcaagagcg	gctcctacta	cgacttcgac	ggaaccagcc	tgcgcggcgc	cttcctgcgt		900	
accgccctga	agttcagccg	catcagctcg	accttcggca	tgcgcatgca	tcccatccac		960	
aagacctgga	ccggccacaa	gggcgtcgat	tacgcggccc	ccacgggcac	cccgatccac		1020	
gccacggccg	acggcacggt	ggagttcgcg	ggctggcaga	acggctacgg	caatgtggtc		1080	
atcatcaagc	accacggcaa	gtactcgacg	ctgtacgccc	accagagccg	catcgccctc		1140	
ggcctcaaga	aaggccagaa	aatcgcccag	ggcgaactgg	tcggctacgt	cggctcgacc		1200	
ggctggggcca	ccggccccgca	cctgcactac	gagttccgcg	tcaacaacca	gccgatcgac		1260	
ccgctcgcg	tcgacctgcc	ggtggcgcg	aagctggaac	ccgccgaact	gcgcgccttc		1320	
acgcaggcgg	tgacagccgta	caagcagcag	atcaagctgc	tgaccgagtt	ccagcagacc		1380	
ctgccggaag	gctcggccac	cgtggccagc	cgctga				1416	

<210> 49

<211> 1566

<212> ADN

<213> Bordetella pertussis

<400> 49

ES 2 808 659 T3

atgcggggtcgc	cggcggggttt	gctgggtgtgg	gcggcggttg	cggtagcgcc	accggcggcc	60
tgggcgggttt	cggacctggc	gggtcgccag	tccgaagccg	aacgacagca	ggccgcgctg	120
cgcgaccgca	tgcgacgcgt	gcagaaagag	atcgacacgc	gcgaggccgc	ccgcaaggag	180
gccgccgacg	cgttgaagga	atccgaatca	gccatttcgc	gcataaatct	ccggctgcgt	240
gaattgggcg	aggccagccg	caaggccgaa	gccgaactcg	ccggcctgga	aaagcaggtg	300
gtggcgcagc	aggcggtgct	gcaaaaagcg	cgcgccgagc	tggccgacca	gctgcgcacc	360
cagtaacacca	gcggcctgtc	gccctggagc	gccctgctgt	cggcgacga	cccgacgacg	420
ctgggcgcga	acctgggcta	cctggactat	gtatcgcgcg	cccgcgcgca	ggcggtgcata	480
gcgttgcgcg	aggatatcgc	ccggctcgcg	gcgctgcagg	ggcaggccga	tgcccgccgc	540
gacgacatcc	agacgctggt	ggccgagacg	tccagccaga	aggccgcgct	ggtcgaacag	600
cagaaaaccc	gcgccaccct	gttggcgaaa	ttagagggac	agattgcggc	gcaacgcgcc	660
gaggcccgca	agctgggccc	tgacgaccag	cggctgtcgc	acctgatcga	cgacctggga	720
agcgccatcg	cgcgccaggc	ggaggaagat	gcccgcgggc	gcgccgccga	ggaggcccg	780
cgcaaggaag	aggaagcccg	ccaggccgag	gccgcgcgcc	gcgccgaggc	ggcgcgccag	840
caggaggcgc	cccgtcaggc	cgccgcggcc	cgcgaggccg	acgccccggc	ccaggccgag	900
acggcccgc	aggcgcagca	ggcgccgat	gccgaggcgc	cgacagccgc	cgcgcgcgc	960
gagcaggccg	aggcgccgc	ccgcagggg	cgcgcggccg	tggcgctggc	cgaccctgac	1020
gccgctggcc	tgcgcagggt	cgagggcggc	cggctggtcg	atccgcaggc	cgcgccggcg	1080
cgcgaaaccc	gcccggcggc	tcgcgccgaa	ccggccgagc	cggcgccgcg	cgaggccgcg	1140
cctgcccgta	cggcgtccgc	cgccccggtg	ggcgcgggca	atggcctgcg	gcgcgggctg	1200
ccgatgccgc	tgcgcgggac	gatccagggc	cgcttcggcg	tcgaccgccc	cgatggcggc	1260
gtgtggcgcg	ggctggtact	gcgcaccgcc	gagggcacgc	cggtcaaggt	ggtggctccc	1320
ggcaccgtgg	tctacgccga	atggctgagg	ggtttttggca	atctcatcat	tgtcgaccat	1380
ggacagcagt	acctgacggt	atacgcttac	aaccagagcc	tgctcaaacg	ggtgggcgac	1440
cgggtggcgc	caggcgatac	tattgctacg	gtaggcgcgca	ccggcggccca	agtggaatcg	1500
ggcctatact	ttgaaattcg	ccatcgtggc	gcaccggtgg	acccggccca	gtggctggcc	1560
caataa						1566

<210> 50
<211> 744
<212> ADN
<213> Bordetella pertussis

<400> 50						
gtgccccgaa	tcgcgtgttc	ccgccagcca	tccgagccct	cggcgggccgg	agggcggtctg	60
tggcgcccg	tgcgcgcgct	gctggcggcg	ctggccctgg	cgctgctggc	cgcggtgcgga	120
tcgacctcg	gcggcagcgg	cggcgccctc	taccgcgtgc	aaagcggcga	cacgctgcac	180
agcatcgcg	gcaagcatgg	ccagagcgtc	ggcgacctgg	tgcgctggaa	caagctggcc	240
aacgccaacc	gcatcgagaa	ggggcagttg	ctgcgcgtca	agccgcgggg	cacgggcggc	300
agcgccagcc	cgccgcccgc	cgcgccagc	ggcaagagcg	ccggcggggc	gcccgcgaag	360
ccggcccgcg	cgatacgcg	cattacgctg	atatggccgg	ccgacggcaa	ggtcacgcgc	420
caattcaacg	gctccagcgt	cctgggcctc	accatcgcca	acagcgccgg	cgcgctcggtg	480
gtggcgggcc	cgggcggcac	ggtcgccctc	gccagcaatg	gcttgcgcg	ctacggcaac	540
ctggtcatcg	tgcgccacga	cggcagcttc	ctgaccatct	acgcgcacaa	ccgcaaactg	600
ctggtcaagc	agggccagcg	cgtgtcgcaa	ggccagcgga	tcgccgagat	gggcgacacc	660
gacagcagcc	aggtcaacct	gtatttcgaa	ttgcgcgcgc	acggcaaggc	cgtcaacccc	720
gccggcgcc	tgccccgcgc	ctga				744

<210> 51
<211> 930
<212> **ADN**
<213> Bordetella pertussis

<400> 51

ttgctggtgg	gcgccacctt	gctgaccgcc	gcatcggtgg	gcgcggccgt	gcaacgctat	60
atgtccccgt	cggctccggc	cgcgtacgcg	gtcgattggc	ctgcctacgc	ccaggccgtc	120
agccccgacc	gggatacggc	gttcgtgcgt	gagaacgtta	ccatgcttgc	caccaagggtc	180
ggcacgctgc	aggccaagct	ggccagtatc	gacgggctgg	ggcggcgcg	ggcccagggtg	240
gccgggggtcg	cctataccga	cccggaaactg	gccacccagc	tgcagggcat	ggccgaggaa	300
gccacccacg	tgatggatga	cctgttcacc	gaccggcagc	cgcgctcgcc	ggccacggcc	360
gccgacctgg	cgcagcagct	cgacgagatc	caggtagcga	tggcgcagca	ggccgacaac	420
ctgcggctgc	tggatgcagc	cctgacgcgc	cgttcgcgcg	acaaggcgct	gctgccttcg	480
gcatgcccc	tactgaata	cccctacctc	agttcatcgt	atggctggcg	ccgcaaccgc	540
gtgacggggc	gctacgccat	gcacgaagg	ctcgatttct	cggcgcccag	cggcacgccc	600
atcctggcgg	cgtcgggggg	cgtggtgctg	gtggccaaat	accagagcgg	ctacggcaac	660
agcgtggaaa	tcgaccacgg	caacggcctg	atcacacgtt	acgcccacgc	ctcgcgcctg	720
ctggtcaagc	cgggcgacgt	ggtcgagcgc	ggccaggaga	tcgcccgcgt	gggctcgtcg	780
ggcgttcca	ccgggcccga	cctgcatttc	gaggtgcggc	tggccggcca	gccgctggat	840
ccgcgcctgt	tcctggggcc	ccagcagacg	gcgcgcgcca	ccgtggccca	ggcgccagcc	900
acggcgcccg	cggcttcggc	gaccgcgtga				930

<210> 52

<211> 861

<212> **ADN**

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 52

gtgagcgcg	ccgcccgcct	gtggcgcggc	gcctggctgg	cgtggccct	gctggccgcc	60
cagggcgcgc	aggcacagg	ctacatcagc	cgaagctga	gcgcgccgg	ggccggcggg	120
gtggccgtgg	tggacctgg	gcaggccgcc	caggcgccgg	aggtcacgta	ccgcggccgt	180
cccgtcatgg	tgtgcgcga	agccgacggc	ccgtggatcg	ccgtggtcgg	cattccgctg	240
gcggccaggc	ccggcagcga	ggcgatctcg	gtgcgggggt	ccggcggcgc	ggtgcgcagc	300
attgcattcg	atatcggcgc	caaaaagtac	acggcccagc	acatcaagct	gaagaaccag	360
cggcaggtca	cgcccaatcc	ggacgacctc	aagcgcatcg	agcgcgaaact	ggccgagcag	420
acggacgcct	atcgcatctt	ccgggcccgc	gtcacgccc	gcaacgtgct	gctggaccgc	480
ccggtgccgg	gccggctgtc	cagcccgttc	ggcctgcggc	gctttttcaa	cggccaggag	540
cgaacccgc	attccgggct	ggatttcgcc	gccgcgcgg	gcacgccgat	caaggcgccg	600
gcggccgggc	gcgtcgtgct	ggtgggcgat	tacttcttca	acggcaggac	ggtgttcgtc	660
gaccacgggc	agggttcat	cagcatgttc	tgccacatgt	cggagatcga	cgtgaagggtg	720
ggcgacgaag	tgcgcgcgg	cgggggtggtg	ggcaagggtg	gcgccaccgc	gcgcgccacc	780
gggcccgcac	tgcactggaa	catcagcctg	aacgacgcgc	gcgtcgatcc	ggccatcttc	840
atcggggcgt	tcaagcccta	g				861

<210> 53

<211> 294

<212> **PRT**

10 <213> Bordetella pertussis

<400> 53

ES 2 808 659 T3

Met 1	Leu	Asn	Gly	Gln 5	Leu	Gln	Leu	Thr	Glu 10	Ser	Gln	Ser	Val	Ala 15	Gly
Ala	Ser	Ala	Ala 20	Ala	Ala	Ser	Arg	Pro 25	Val	Leu	Trp	Ala	Gly 30	Val	Leu
Ala	Ile	Ala 35	Leu	Leu	Ala	Gly	Cys 40	Ala	Ser	Lys	Gly	Pro 45	Arg	Ala	Pro
Val 50	Val	Asp	Leu	Thr	Gly	Gln 55	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly 60	Pro	Thr	Asp	Gly
Ser 65	Tyr	Val	Val	Lys	Pro 70	Gly	Asp	Thr	Leu	Tyr 75	Lys	Ile	Ala	Arg	Ala 80
Asn	Asn	Val	Asp	Ile	Glu	Asn	Leu	Lys	Arg	Trp	Asn	Asn	Leu	Thr	Asp
85				90				95							
Pro	Asn	Gln	Ile 100	Ser	Val	Gly	Gln	Val 105	Leu	Arg	Leu	Ser	Ser 110	Ser	Gly
Ala	Gly	Gly 115	Ala	Gln	Thr	Thr	Pro 120	Val	Thr	Ser	Ser	Lys 125	Pro	Gln	Pro
Lys 130	Pro	Leu	Asp	Gln	Gly	Ser 135	Ala	Glu	Thr	Pro	Ala 140	Gly	Gly	Met	Glu
Ala 145	Gly	Ala	Gly	Gly	Glu 150	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr 155	Thr	Pro	Pro	Ala	Ala 160
Thr	Val	Pro	Asp	Pro 165	Lys	Pro	Ala	Arg	Ala 170	Ala	Asp	Ala	Ala	Val 175	Ile
Asn	Trp	Gly	Trp 180	Pro	Ala	Asn	Gly	Ala 185	Ile	Leu	Gln	Thr	Phe 190	Asn	Ser
Asn	Thr	Lys 195	Gly	Ile	Asp	Leu	Ala 200	Gly	Ser	Leu	Gly	Asp 205	Pro	Val	Ile
Ala 210	Ala	Ala	Asp	Gly	Lys	Val 215	Met	Tyr	Ser	Gly	Asn 220	Gly	Val	Arg	Gly
Leu 225	Gly	Asn	Leu	Ile	Ile 230	Ile	Asn	His	Gln	Asn 235	Gly	Phe	Ile	Thr	Ala 240
Tyr	Ala	His	Asn	Arg 245	Ala	Leu	Leu	Val	Lys 250	Thr	Gly	Gln	Asn	Val 255	Lys
Arg	Gly	Ala	Lys 260	Ile	Ala	Glu	Ile	Gly 265	Glu	Thr	Asp	Thr	Thr	Ser	Pro
Arg	Leu	His 275	Phe	Glu	Ile	Arg	Arg 280	Gln	Gly	Thr	Pro	Val 285	Asp	Pro	Met
Gln 290	Tyr	Leu	Pro	Pro	Arg										

<210> 54

ES 2 808 659 T3

<211> 471

<212> **PRT**

<213> Bordetella pertussis

<400> **54**

Met	Asn	Arg	Gly	Pro	Asn	Ser	Leu	Val	Arg	Ser	Phe	Lys	Arg	Lys	Val
1				5					10					15	
Ala	Ala	Leu	Phe	Ala	Pro	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Ser	Arg	Gly	Gly	Ala
			20					25					30		
Leu	Leu	Arg	Arg	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Ala	Gly
		35					40					45			
Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Met	Val	Gln	Gln	Pro	Asp	Arg	Ser	Glu	Leu	Pro
		50				55					60				
Pro	Leu	Arg	Leu	Ile	Asp	Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Glu	Ala	Gly	Gln	Met
65					70					75					80
Gln	Val	Ser	Asp	Ala	Ser	Asn	Ala	Pro	Tyr	Ile	Ser	Glu	Thr	Arg	Ile

ES 2 808 659 T3

85										90					95				
Arg	Ala	Gly	Asp	Thr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gln	Arg	Leu	Asp	Ile	Asp				
			100					105					110						
Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	Asn	Phe	Leu	Thr	His	Asp	Ala	Ser	Ala	Arg	Ser				
		115					120					125							
Ile	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ser	Val	Gln	Ala	Ala	Thr	Asn	Glu				
	130					135					140								
Asn	Gly	Asp	Leu	Val	Trp	Leu	Arg	Tyr	Ile	His	Thr	Pro	Gly	Asn	Glu				
145					150					155					160				
Ser	Gly	Gly	Gln	Val	Val	Thr	Arg	Leu	Leu	His	Val	Ala	Pro	Asp	Gly				
				165					170					175					
Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Ala	Glu	Glu	Val	Thr	Gln	Gly	Thr	Glu	Gln	Gln				
			180					185					190						
Thr	Arg	Val	Ala	Val	Gly	Thr	Ile	Arg	Ser	Ser	Leu	Phe	Gly	Ala	Thr				
		195					200					205							
Asp	Ala	Ala	Gly	Ile	Pro	Asp	Ser	Val	Thr	Met	Gln	Met	Ala	Asp	Ile				
	210					215					220								
Leu	Ser	Ser	Lys	Ile	Asp	Phe	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg	Gln	Gly	Asp	Gln				
225					230					235					240				
Phe	Arg	Val	Val	Tyr	Glu	Val	Arg	Thr	His	Glu	Gly	Arg	Tyr	Ala	Gly				
				245					250					255					
Ala	Gly	Arg	Val	Gln	Ala	Leu	Glu	Phe	Ile	Asn	Gly	Asp	Lys	Thr	Tyr				
			260					265					270						
Asn	Ala	Val	Trp	Phe	Ser	Pro	Asp	Gly	Lys	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Asp				
		275					280					285							
Phe	Asp	Gly	Thr	Ser	Leu	Arg	Gly	Ala	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Lys				
	290					295					300								
Phe	Ser	Arg	Ile	Ser	Ser	Thr	Phe	Gly	Met	Arg	Met	His	Pro	Ile	His				
305					310					315					320				
Lys	Thr	Trp	Thr	Gly	His	Lys	Gly	Val	Asp	Tyr	Ala	Ala	Pro	Thr	Gly				
				325					330					335					
Thr	Pro	Ile	His	Ala	Thr	Ala	Asp	Gly	Thr	Val	Glu	Phe	Ala	Gly	Trp				
			340					345					350						
Gln	Asn	Gly	Tyr	Gly	Asn	Val	Val	Ile	Ile	Lys	His	His	Gly	Lys	Tyr				
		355					360					365							
Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	His	Gln	Ser	Arg	Ile	Ala	Ser	Gly	Leu	Lys	Lys				
	370					375					380								
Gly	Gln	Lys	Ile	Ala	Gln	Gly	Glu	Leu	Val	Gly	Tyr	Val	Gly	Ser	Thr				
385					390					395					400				
Gly	Trp	Ala	Thr	Gly	Pro	His	Leu	His	Tyr	Glu	Phe	Arg	Val	Asn	Asn				
				405					410					415					
Gln	Pro	Ile	Asp	Pro	Leu	Ala	Val	Asp	Leu	Pro	Val	Ala	Arg	Lys	Leu				

ES 2 808 659 T3

				420					425					430			
Glu	Pro	Ala	Glu	Leu	Arg	Ala	Phe	Thr	Gln	Ala	Val	Gln	Pro	Tyr	Lys		
		435					440					445					
Gln	Gln	Ile	Lys	Leu	Leu	Thr	Glu	Phe	Gln	Gln	Thr	Leu	Pro	Glu	Gly		
		450				455					460						
Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Arg											
465					470												

<210> 55

<211> 521

<212> **PRT**

<213> Bordetella pertussis

<400> 55

5

ES 2 808 659 T3

Met	Arg	Val	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Val	Trp	Ala	Ala	Val	Ala	Val	Ala	
1				5					10					15		
Pro	Pro	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Ser	Asp	Leu	Ala	Gly	Arg	Gln	Ser	Glu	
			20					25					30			
Ala	Glu	Arg	Gln	Gln	Ala	Ala	Leu	Arg	Asp	Arg	Ile	Asp	Ala	Leu	Gln	
		35					40					45				
Lys	Glu	Ile	Asp	Thr	Arg	Glu	Ala	Ala	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	
	50					55					60					
Leu	Lys	Glu	Ser	Glu	Ser	Ala	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Leu	Arg	Leu	Arg	
65					70				75						80	
Glu	Leu	Gly	Glu	Ala	Ser	Arg	Lys	Ala	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Gly	Leu	
				85					90					95		
Glu	Lys	Gln	Val	Val	Ala	Gln	Gln	Ala	Val	Leu	Gln	Lys	Arg	Arg	Ala	
			100					105					110			
Glu	Leu	Ala	Asp	Gln	Leu	Arg	Thr	Gln	Tyr	Thr	Ser	Gly	Leu	Ser	Pro	
		115					120					125				
Trp	Thr	Ala	Leu	Leu	Ser	Gly	Asp	Asp	Pro	Gln	Gln	Leu	Gly	Arg	Asn	
	130					135					140					
Leu	Gly	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Val	Ser	Arg	Ala	Arg	Ala	Gln	Ala	Val	His	
145					150				155						160	
Ala	Leu	Arg	Glu	Asp	Ile	Ala	Arg	Leu	Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Gln	Ala	
				165					170					175		
Asp	Ala	Arg	Arg	Asp	Asp	Ile	Gln	Thr	Leu	Val	Ala	Glu	Thr	Ser	Ser	
			180					185					190			
Gln	Lys	Ala	Ala	Leu	Val	Glu	Gln	Gln	Lys	Thr	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	
		195					200					205				
Ala	Lys	Leu	Glu	Gly	Gln	Ile	Ala	Ala	Gln	Arg	Ala	Glu	Ala	Gly	Lys	
	210					215					220					
Leu	Gly	Arg	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Ser	His	Leu	Ile	Asp	Asp	Leu	Gly	
225					230					235					240	
Ser	Ala	Ile	Ala	Arg	Gln	Ala	Glu	Glu	Asp	Ala	Arg	Arg	Arg	Ala	Ala	

245						250						255					
Glu	Glu	Ala	Arg	Arg	Lys	Glu	Glu	Glu	Ala	Arg	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala		
		260						265					270				
Arg	Arg	Ala	Glu	Ala	Ala	Arg	Gln	Gln	Glu	Ala	Ala	Arg	Gln	Ala	Ala		
		275					280					285					
Ala	Ala	Arg	Glu	Ala	Asp	Ala	Arg	Arg	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Arg	Gln		
	290						295				300						
Ala	Gln	Gln	Ala	Arg	Asp	Ala	Glu	Ala	Arg	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg		
305					310					315					320		
Glu	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Arg	Gln	Gly	Arg	Gly	Pro	Val	Ala	Leu		
			325						330					335			
Ala	Asp	Pro	Asp	Ala	Ala	Gly	Leu	Arg	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Leu		
			340					345					350				
Val	Asp	Pro	Gln	Ala	Ala	Pro	Pro	Arg	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Ala	Arg		
		355					360						365				
Ala	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Ala	Pro	Arg	Glu	Ala	Ala	Pro	Ala	Arg	Thr		
	370						375				380						
Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Val	Gly	Gly	Gly	Asn	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Leu		
385					390					395					400		
Pro	Met	Pro	Val	Arg	Gly	Thr	Ile	Gln	Gly	Arg	Phe	Gly	Val	Asp	Arg		
				405					410					415			
Pro	Asp	Gly	Gly	Val	Trp	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Arg	Thr	Ala	Glu	Gly		
			420					425					430				
Thr	Pro	Val	Lys	Val	Val	Ala	Pro	Gly	Thr	Val	Val	Tyr	Ala	Glu	Trp		
		435					440						445				
Leu	Arg	Gly	Phe	Gly	Asn	Leu	Ile	Ile	Val	Asp	His	Gly	Gln	Gln	Tyr		
	450				455					460							
Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Arg	Val	Gly	Asp		
465					470					475					480		
Arg	Val	Ala	Ala	Gly	Asp	Thr	Ile	Ala	Thr	Val	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly		
				485					490					495			
Gln	Val	Glu	Ser	Gly	Leu	Tyr	Phe	Glu	Ile	Arg	His	Arg	Gly	Ala	Pro		
			500					505					510				
Val	Asp	Pro	Ala	Gln	Trp	Leu	Ala	Gln									
		515					520										

<210> 56

<211> 247

<212> PRT

<213> Bordetella pertussis

<400> 56

ES 2 808 659 T3

Met	Pro	Arg	Ile	Ala	Cys	Ser	Arg	Gln	Pro	Ser	Glu	Pro	Ser	Ala	Ala
1				5					10					15	
Gly	Gly	Arg	Leu	Trp	Arg	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala
				20					25					30	
Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Cys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
		35					40					45			
Ala	Phe	Tyr	Arg	Val	Gln	Ser	Gly	Asp	Thr	Leu	His	Ser	Ile	Ala	Arg
	50					55					60				
Lys	His	Gly	Gln	Ser	Val	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Trp	Asn	Lys	Leu	Ala
65					70					75					80
Asn	Ala	Asn	Arg	Ile	Glu	Lys	Gly	Gln	Leu	Leu	Arg	Val	Lys	Pro	Pro
				85					90					95	
Gly	Thr	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys
			100					105						110	
Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala	Lys	Pro	Ala	Ala	Pro	Ile	Arg	Gly	Ile
		115					120					125			
Thr	Leu	Ile	Trp	Pro	Ala	Asp	Gly	Lys	Val	Thr	Arg	Gln	Phe	Asn	Gly
	130					135					140				
Ser	Ser	Val	Leu	Gly	Ile	Thr	Ile	Ala	Asn	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Val
145					150					155					160
Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Val	Ala	Tyr	Ala	Ser	Asn	Gly	Leu	Arg
				165					170					175	
Gly	Tyr	Gly	Asn	Leu	Val	Ile	Val	Arg	His	Asp	Gly	Ser	Phe	Leu	Thr
			180					185					190		
Ile	Tyr	Ala	His	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Val	Lys	Gln	Gly	Gln	Arg	Val
		195					200					205			
Ser	Gln	Gly	Gln	Arg	Ile	Ala	Glu	Met	Gly	Asp	Thr	Asp	Ser	Ser	Gln
	210					215					220				
Val	Asn	Leu	Tyr	Phe	Glu	Leu	Arg	Arg	Asp	Gly	Lys	Ala	Val	Asn	Pro
225					230					235					240
Ala	Gly	Ala	Leu	Pro	Arg	Arg									
				245											

<210> 57

<211> 309

<212> PRT

<213> Bordetella pertussis

<400> 57

ES 2 808 659 T3

Met Leu Val Gly Ala Thr Leu Leu Thr Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Gln Arg Tyr Met Ser Pro Ser Ala Pro Ala Ala Tyr Ala Val Asp
 20 25 30
 Trp Pro Ala Tyr Ala Gln Ala Val Ser Pro Asp Arg Asp Thr Ala Phe
 35 40 45
 Val Arg Glu Asn Val Thr Met Leu Ala Thr Lys Val Gly Thr Leu Gln
 50 55 60
 Ala Lys Leu Ala Ser Ile Asp Gly Leu Gly Arg Arg Val Ala Gln Val
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Ala Tyr Thr Asp Pro Glu Leu Ala Thr Gln Leu Gln Gly
 85 90 95
 Met Pro Glu Glu Ala Thr His Val Met Asp Asp Leu Phe Thr Asp Arg
 100 105 110
 Gln Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ala Ala Asp Leu Ala Gln Gln Leu Asp
 115 120 125
 Glu Ile Gln Val Arg Met Ala Gln Gln Ala Asp Asn Leu Arg Leu Leu
 130 135 140
 Asp Ala Ala Leu Thr Arg Arg Ser Ala Asp Lys Ala Leu Leu Pro Ser
 145 150 155 160
 Ala Met Pro Ile Thr Glu Tyr Pro Tyr Leu Ser Ser Ser Tyr Gly Trp
 165 170 175
 Arg Arg Asn Pro Val Thr Gly Arg Tyr Ala Met His Glu Gly Leu Asp
 180 185 190
 Phe Ser Ala Pro Ser Gly Thr Pro Ile Leu Ala Ala Ser Gly Gly Val
 195 200 205
 Val Leu Val Ala Lys Tyr Gln Ser Gly Tyr Gly Asn Ser Val Glu Ile
 210 215 220
 Asp His Gly Asn Gly Leu Ile Thr Arg Tyr Ala His Ala Ser Arg Leu
 225 230 235 240
 Leu Val Lys Pro Gly Asp Val Val Glu Arg Gly Gln Glu Ile Ala Arg
 245 250 255
 Val Gly Ser Ser Gly Arg Ser Thr Gly Pro His Leu His Phe Glu Val
 260 265 270
 Arg Leu Ala Gly Gln Pro Leu Asp Pro Arg Leu Phe Leu Gly Pro Gln
 275 280 285
 Gln Thr Ala Pro Pro Thr Val Ala Gln Ala Pro Ala Thr Ala Pro Ala
 290 295 300
 Ala Ser Ala Thr Arg
 305

<210> 58
 <211> 286

ES 2 808 659 T3

<212> PRT

<213> Bordetella pertussis

<400> 58

```

Met Ser Ala Ala Ala Arg Leu Trp Arg Gly Ala Trp Leu Ala Leu Ala
1          5          10          15

Leu Leu Ala Ala Gln Gly Ala Gln Ala Gln Gly Tyr Ile Ser Arg Lys
          20          25          30

Leu Ser Ala Pro Val Pro Gly Gly Val Ala Val Val Asp Leu Gly Gln
          35          40          45

Ala Ala Gln Ala Pro Glu Val Thr Tyr Arg Gly Arg Pro Val Met Val

          50          55          60

Leu Arg Glu Ala Asp Gly Pro Trp Ile Ala Val Val Gly Ile Pro Leu
65          70          75          80

Ala Ala Arg Pro Gly Ser Glu Ala Ile Ser Val Arg Gly Ser Gly Gly
          85          90          95

Ala Val Arg Ser Ile Ala Phe Asp Ile Gly Ala Lys Lys Tyr Thr Ala
          100          105          110

Gln His Ile Lys Leu Lys Asn Gln Arg Gln Val Thr Pro Asn Pro Asp
          115          120          125

Asp Leu Lys Arg Ile Glu Arg Glu Leu Ala Glu Gln Thr Asp Ala Tyr
          130          135          140

Arg Ile Phe Arg Ala Gly Val Thr Pro Ser Asn Val Leu Leu Asp Arg
          145          150          155          160

Pro Val Pro Gly Arg Leu Ser Ser Pro Phe Gly Leu Arg Arg Phe Phe
          165          170          175

Asn Gly Gln Glu Arg Asn Pro His Ser Gly Leu Asp Phe Ala Ala Ala
          180          185          190

Ala Gly Thr Pro Ile Lys Ala Pro Ala Ala Gly Arg Val Val Leu Val
          195          200          205

Gly Asp Tyr Phe Phe Asn Gly Arg Thr Val Phe Val Asp His Gly Gln
          210          215          220

Gly Phe Ile Ser Met Phe Cys His Met Ser Glu Ile Asp Val Lys Val
          225          230          235          240

Gly Asp Glu Val Pro Arg Gly Gly Val Val Gly Lys Val Gly Ala Thr
          245          250          255

Gly Arg Ala Thr Gly Pro His Leu His Trp Asn Ile Ser Leu Asn Asp
          260          265          270

Ala Arg Val Asp Pro Ala Ile Phe Ile Gly Ala Phe Lys Pro
          275          280          285

```

5

<210> 59

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 59
 5 ccggaattcg cggttgcgcg cgcagggcat 30
 <210> 60
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 60
 ggaggatcca cgattctcct gtttgctcaa 30
 <210> 61
 15 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 61
 ggaggatccc gccacgctc gtttcgacc 30
 <210> 62
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 62
 cccaagcttc cacgtcggtc tcgcagtacg 30
 30 <210> 63
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador
 <400> 63
 aacctgggct tgaactcc 18
 <210> 64
 <211> 18
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 64
 45 acaccagcca ggtattga 18
 <210> 65
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>

<223> Cebador
 <400> 65
 ccggaattca tcaagaagct gggacgt 27
 5 <210> 66
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 66
 ggaggatcca actttgcgtt tgaagct 27
 <210> 67
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 67
 ggaggatccc aagcagcaga tcaagct 27
 20 <210> 68
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 68
 cccaagcttg tcggcgtcgt aaggctg 27
 <210> 69
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 69
 35 ccggaattct ggaaaaccgt ttcacgg 27
 <210> 70
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 70
 ggaggatccg aatcagtcct tttcgc 27
 <210> 71
 45 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 71

ggaggatcca taaatatcgg gaagtgt 27

<210> 72
<211> 27
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 72
cccaagcttc cgagttcctt cagatgg 27

10 <210> 73
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Cebador

<400> 73
ccggaattcc atgatgccga cttgcat 27

<210> 74
<211> 27
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 74
25 ggaggatcct gaaagaggca gcaaaac 27

<210> 75
<211> 27
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 75
ggaggatccc cggcgaaaca gcacgta 27

<210> 76
35 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 76
40 cccaagctta gtcgaagct ggcattg 27

<210> 77
<211> 27
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 77
ccggaattct tgccgatatc ggttttc 27

50 <210> 78

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Cebador

 <400> 78
 ggaggatcct tgcacctgt tattga 27

 10 <210> 79
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 15 <400> 79
 ggaggatccg ttaaactgga tcgttc 27

 <210> 80
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 80
 cccaagcttt cgaagccgaa ttcgta 27

 25 <210> 81
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 30 <400> 81
 ccggaattca gcagatgccc cagatca 27

 <210> 82
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 82
 ggaggatcct tgcgtcggtc ttgcct 27

 40 <210> 83
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Cebador

 <400> 83
 ggaggatcct tcggcgatt gcagtc 27

 <210> 84
 <211> 27
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 84

cccaagcttt gagtacctgc ctatcgt 27

5

<210> 85

<211> 433

<212> PRT

<213> Haemophilus influenzae

<400> 85

Ser	Glu	Glu	Asn	Pro	Ile	Phe	Ser	Thr	Ser	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	His	1	5	10	15
Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Pro	Asn	Lys	Asn	Ser	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Asp	20	25	30	
Glu	Asp	Ala	Thr	Ser	Tyr	Asp	Asp	Glu	Leu	Gln	Ala	Lys	Asp	Asp	Glu	35	40	45	
Val	Asp	Glu	Val	Lys	Leu	Ser	Ser	Asp	Asp	Leu	Gly	Thr	Leu	Pro	Gln	50	55	60	
His	Ala	Gln	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	Leu	Leu	Asp	Ala	Ala	Asp	Gln	Ala	65	70	75	80
Ile	Arg	Ile	Thr	Asp	Gln	Phe	Ser	Tyr	Thr	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	Thr	85	90	95	
Leu	Lys	Asp	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Asp	Ser	Ser	Val	Gln	100	105	110	
Pro	Leu	Ile	Lys	Leu	Asp	Pro	Glu	Leu	Ala	His	Leu	Lys	Ala	Gly	Gln	115	120	125	
Gln	Phe	Tyr	Trp	Ile	Leu	Asn	Lys	Asn	Asp	Asn	Leu	Glu	Tyr	Leu	Asn	130	135	140	
Trp	Leu	Val	Ser	Glu	Lys	Glu	Glu	Arg	Ile	Tyr	Glu	Arg	Leu	Glu	Asp	145	150	155	160
Gly	Lys	Phe	Lys	Arg	Gln	Val	Ile	Glu	Lys	Lys	Ser	Ile	Trp	Arg	Lys	165	170	175	
Glu	Val	Leu	Lys	Gly	Glu	Ile	Gln	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Ser	Leu	Arg	180	185	190	
Glu	Gln	Gly	Leu	Asp	Thr	Arg	Gln	Ile	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Ala	Leu	195	200	205	
Gln	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Gly	Thr	Gln	Phe	Ala	210	215	220	

10

ES 2 808 659 T3

Ile Leu Val Ser Arg Glu Tyr Leu Gly Asp Lys Leu Thr Gly Gln Gly
 225 230 235 240

Asn Val Glu Ala Leu Arg Ile Ser Ser Gly Gly Lys Asn Tyr Tyr Ala
 245 250 255

Val Gln Ala Ala Asn Gly Arg Tyr Tyr Asn Gln Gln Gly Glu Thr Leu
 260 265 270

Gly Lys Gly Phe Ala Arg Tyr Pro Leu Gln Arg Gln Ala Arg Val Ser
 275 280 285

Ser Pro Phe Asn Pro Asn Arg Arg His Pro Val Thr Gly Arg Val Arg
 290 295 300

Pro His Lys Gly Val Asp Phe Ser Val Ser Gln Gly Thr Pro Val Ile
 305 310 315 320

Ala Pro Ala Asp Gly Thr Val Glu Lys Val Ala Tyr Gln Ala Gly Gly
 325 330 335

Ala Gly Arg Tyr Val Met Leu Arg His Gly Arg Glu Tyr Gln Thr Val
 340 345 350

Tyr Met His Leu Ser Lys Ser Leu Val Lys Ala Gly Gln Thr Val Lys
 355 360 365

Lys Gly Glu Arg Ile Ala Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ile Ser Thr Gly
 370 375 380

Pro His Leu His Tyr Glu Phe Arg Ile Asn Gly Arg Ala Val Asn Pro
 385 390 395 400

Leu Thr Val Lys Leu Pro Gly Thr Ser Ser Gly Met Thr Ser Ala Glu
 405 410 415

Arg Lys Gln Phe Leu Val Arg Val Arg Glu Ala Glu Lys Met Leu Lys
 420 425 430

Pro

<210> 86
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Haemophilus influenzae
 <400> 86

ES 2 808 659 T3

Gly	Leu	Leu	Ile	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	Gln	Ser	Ser	Asp	Leu	Asn	Gln
1				5					10					15	
Ile	Gln	Lys	Gln	Ile	Lys	Gln	Gln	Glu	Ser	Lys	Ile	Glu	Lys	Gln	Lys
			20					25					30		
Arg	Glu	Gln	Ala	Lys	Leu	Gln	Ala	Asn	Leu	Lys	Lys	His	Glu	Ser	Lys
		35					40					45			
Ile	Asn	Thr	Val	Glu	Gly	Glu	Leu	Leu	Glu	Thr	Glu	Ile	Ser	Leu	Lys
	50					55					60				
Glu	Ile	Arg	Lys	Gln	Ile	Ala	Asp	Ala	Asp	Lys	Gln	Phe	Lys	Gln	Leu
65					70					75					80

Glu Lys Gln Glu Arg Glu Gln Lys Ala Arg Leu Ala Lys Gln Met Asp
 85 90 95
 Ile Ile Tyr Arg Ser Gly Ile Asn Pro Ser Leu Ile Glu Arg Met Phe
 100 105 110
 Ala Gln Asp Pro Thr Lys Ala Glu Arg Met Lys Val Tyr Tyr Gln His
 115 120 125
 Leu Asn Gln Val Arg Ile Glu Met Ile Asp Asn Leu Lys Ala Thr Gln
 130 135 140
 Ala Gln Ile Ala Val Gln Lys Glu Ala Ile Leu Ala Gln Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 His Arg Asn Gln Leu Ser Thr Gln Lys Lys Gln Gln Gln Ala Leu Gln
 165 170 175
 Lys Ala Gln Gln Glu His Gln Ser Thr Leu Asn Glu Leu Asn Lys Asn
 180 185 190
 Leu Ala Leu Asp Gln Asp Lys Leu Asn Ala Leu Lys Ala Asn Glu Gln
 195 200 205
 Ala Leu Arg Gln Glu Ile Gln Arg Ala Glu Gln Ala Ala Arg Glu Gln
 210 215 220
 Glu Lys Arg Glu Arg Glu Ala Leu Ala Gln Arg Gln Lys Ala Glu Glu
 225 230 235 240
 Lys Arg Thr Ser Lys Pro Tyr Gln Pro Thr Val Gln Glu Arg Gln Leu
 245 250 255
 Ile Asn Ser Thr Ser Gly Leu Gly Ala Ala Lys Lys Gln Tyr Ser Leu
 260 265 270
 Pro Val Ser Gly Ser Ile Leu His Thr Phe Gly Ser Ile Gln Ala Gly
 275 280 285
 Glu Val Arg Trp Lys Gly Met Val Ile Gly Ala Ser Ala Gly Thr Pro
 290 295 300
 Val Lys Ala Ile Ala Ala Gly Arg Val Ile Leu Ala Gly Tyr Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Tyr Gly Tyr Met Val Ile Val Lys His Gly Glu Thr Asp Leu Ser
 325 330 335
 Leu Tyr Gly Phe Asn Gln Ala Val Ser Val Lys Val Gly Gln Leu Val
 340 345 350
 Ser Ala Gly Gln Val Ile Ala Gln Val Gly Asn Thr Gly Glu Ile Ser
 355 360 365
 Arg Ser Ala Leu Tyr Phe Gly Ile Ser Arg Lys Gly Thr Pro Val Asn
 370 375 380
 Pro Ala Gly Trp Val Arg
 385 390

<211> 387
<212> **PRT**
<213> Haemophilus influenzae
<400> 87

ES 2 808 659 T3

Thr 1	Ser	Asn	Phe	Pro 5	Ala	Pro	Ile	Ser	Asp 10	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	15
Pro	Ser	Val	Ile 20	Gln	Ser	Val	Asn	Gly 25	Ser	Asn	Val	Gly	Gly	Ala	Trp	30
Gln	Pro	Glu 35	Ile	Gln	Lys	Asn 40	Ser	Leu	Pro	Thr	Thr	Gly 45	Asn	Met	Val	
Thr 50	Pro	Gln	Pro	Asn	Phe	Gln 55	Pro	Ile	Asn	Gln	Gln	Pro	Thr	Met	Pro	
Thr 65	Ala	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala 70	Phe	Gln	Pro	Ser 75	Pro	Lys	Thr	Val	Val	80
Ser	Ala	Pro	Thr	Val 85	Gln	Thr	Lys	Thr	Val 90	Thr	Lys	Thr	Val	Ala	Asp	95
Cys	Val	Asp	Gly 100	Gln	His	Ile	Asn	Ile 105	Pro	Arg	Asn	Pro	Asn	Thr	Asn	
Val	Pro	Asp 115	Tyr	Ser	Lys	Ile	Ser 120	Lys	Gly	Ser	Tyr	Lys 125	Gly	Asn	Thr	
Tyr 130	Lys	Val	Asn	Lys	Gly	Asp 135	Thr	Met	Phe	Leu	Ile 140	Ala	Tyr	Leu	Ala	
Gly 145	Ile	Asp	Val	Lys	Glu 150	Leu	Ala	Ala	Leu	Asn 155	Asn	Leu	Ser	Glu	Pro	160
Tyr	Asn	Leu	Ser	Leu 165	Gly	Gln	Val	Leu	Lys 170	Ile	Ser	Asn	Cys	Ser	Thr	
Lys	Thr	Val	Thr 180	Thr	Thr	Val	Ser	Val 185	Lys	Gln	Pro	Ala	Val	Thr	Thr	
Ser	Thr	Ala 195	Thr	Pro	Val	Lys	Pro 200	Ala	Val	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Ala	
Asn 210	Gly	Thr	Gln	Ile	Gly	Ser 215	Asp	Gly	Thr	Ile	Ile	Gly	Pro	Ile	Lys	
Ser 225	Glu	Ala	Gly	Thr	Ser	Pro 230	Ser	Val	Pro	Val 235	Ala	Thr	Ser	Ser	Thr	240
Gln	Val	Thr	Ser	Ser 245	Val	Asn	Asn	Ala	Asn 250	Ser	Thr	Pro	Ile	Asn	Ser	
Asn	Val	Val	Ala 260	Pro	Ile	Ala	Ser	His 265	Val	Val	Trp	Gln	Trp	Pro	Thr	
Ser	Gly	Asn 275	Ile	Ile	Gln	Gly	Phe 280	Ser	Ser	Thr	Asp	Gly	Gly	Asn	Lys	
Gly 290	Ile	Asp	Ile	Ser	Gly	Ser 295	Arg	Gly	Gln	Ala	Val 300	Lys	Ala	Ala	Ala	
Ala 305	Gly	Arg	Ile	Val	Tyr 310	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu 315	Arg	Gly	Tyr	Gly	Asn	320

ES 2 808 659 T3

Leu	Ile	Ile	Ile	Lys	His	Asn	Asp	Asp	Phe	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	His
				325					330					335	
Asn	Asp	Lys	Ile	Leu	Val	Ala	Asp	Gln	Gln	Glu	Val	Lys	Ala	Gly	Gln
			340					345					350		
Asp	Ile	Ala	Lys	Met	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Asn	Thr	Val	Lys	Leu	His
		355					360					365			
Phe	Glu	Ile	Arg	Tyr	Lys	Gly	Lys	Ser	Val	Asp	Pro	Val	Arg	Tyr	Leu
	370					375					380				
Pro	Arg	His													
385															

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar vesículas a partir de una bacteria gramnegativa en el que al menos una proteína que contiene un dominio catalítico LytM se inactiva comprendiendo una etapa de obtención de vesículas a partir de un cultivo de la bacteria, en el que:

5 (a) la al menos una proteína que contiene un dominio catalítico de LytM se inactiva mediante una mutación de inactivación génica en la región codificante del gen o su promotor que:

(i) reduce el nivel de ARNm que codifica la proteína al 0 % de aquel producido por la bacteria de tipo silvestre;
o

10 (ii) inhibe la traducción del ARNm que codifica la proteína al 0 % de aquel producido por la bacteria de tipo silvestre.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la al menos una proteína que contiene el dominio catalítico LytM se selecciona de una cualquiera de NT013, NT022 y NT017 de NTHi, en la que:

NT013 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o comparte una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO: 1,

15 NT022 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 o comparte una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO: 5 y

NT017 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o comparte una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO: 3.

20 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que la bacteria gramnegativa se selecciona de *H. influenzae* no tipificable, *N. meningitidis* y *B. pertussis*.

4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las vesículas no comprenden ninguna bacteria viva y/o entera.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de mezclar vesículas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

Figura 1

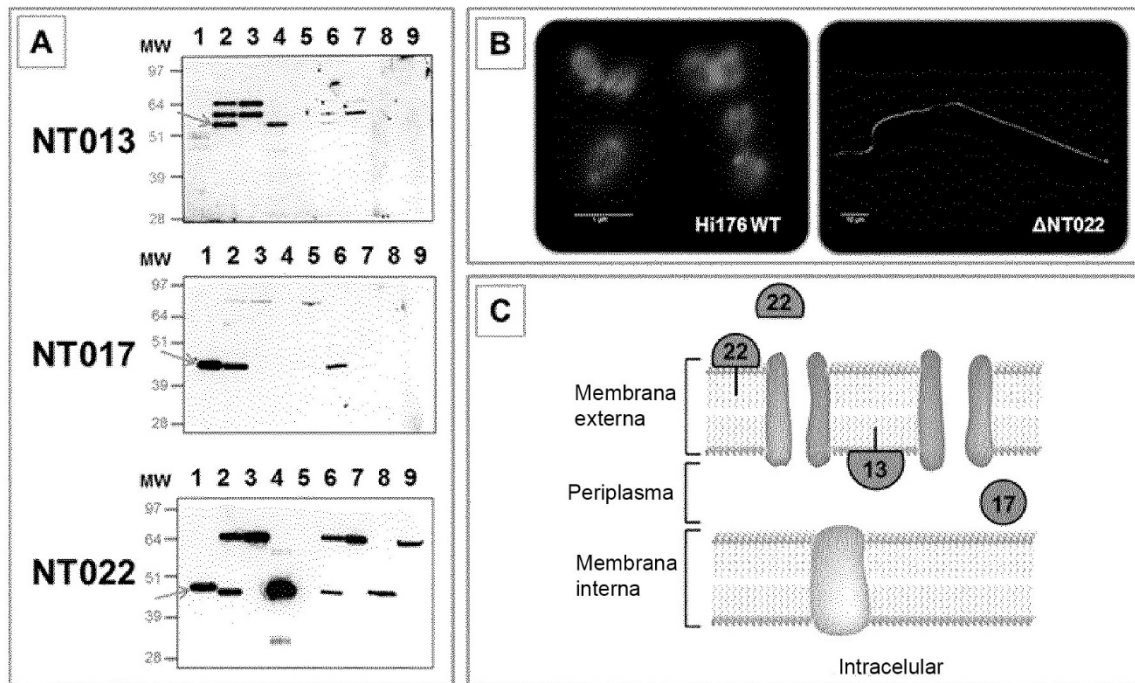


Figura 2

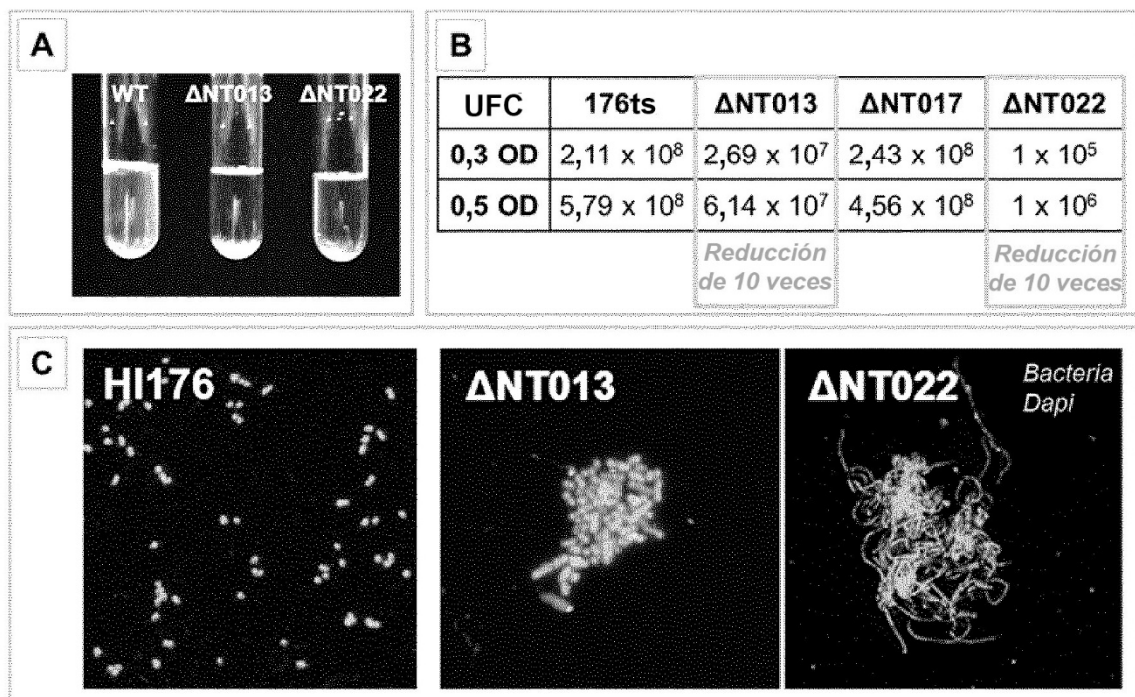


Figura 3

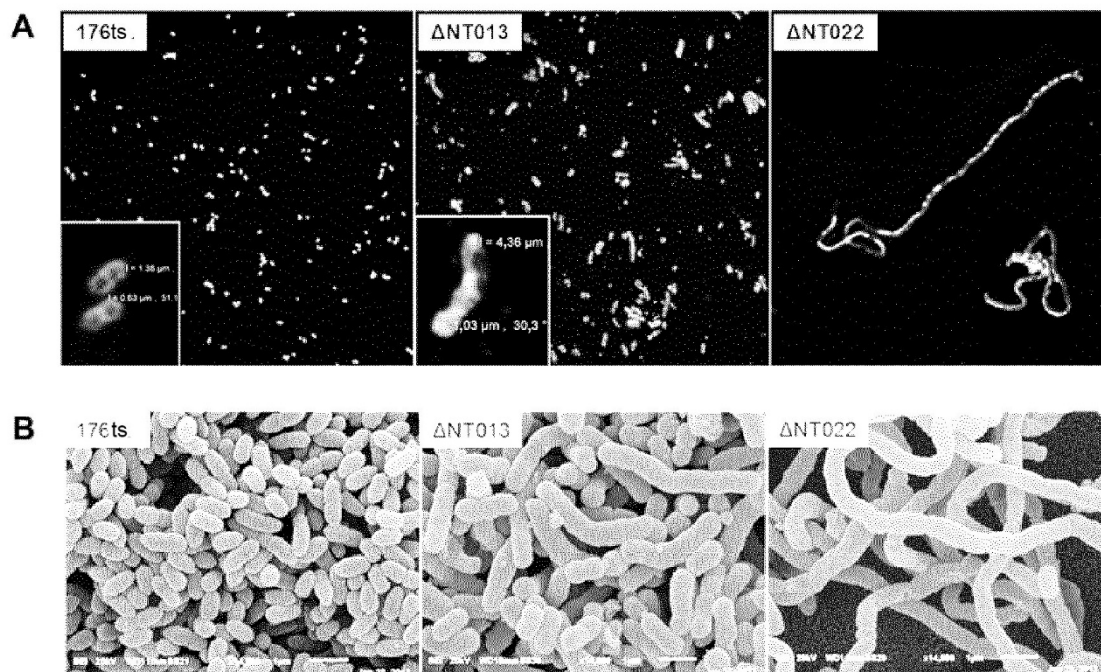


Figura 4

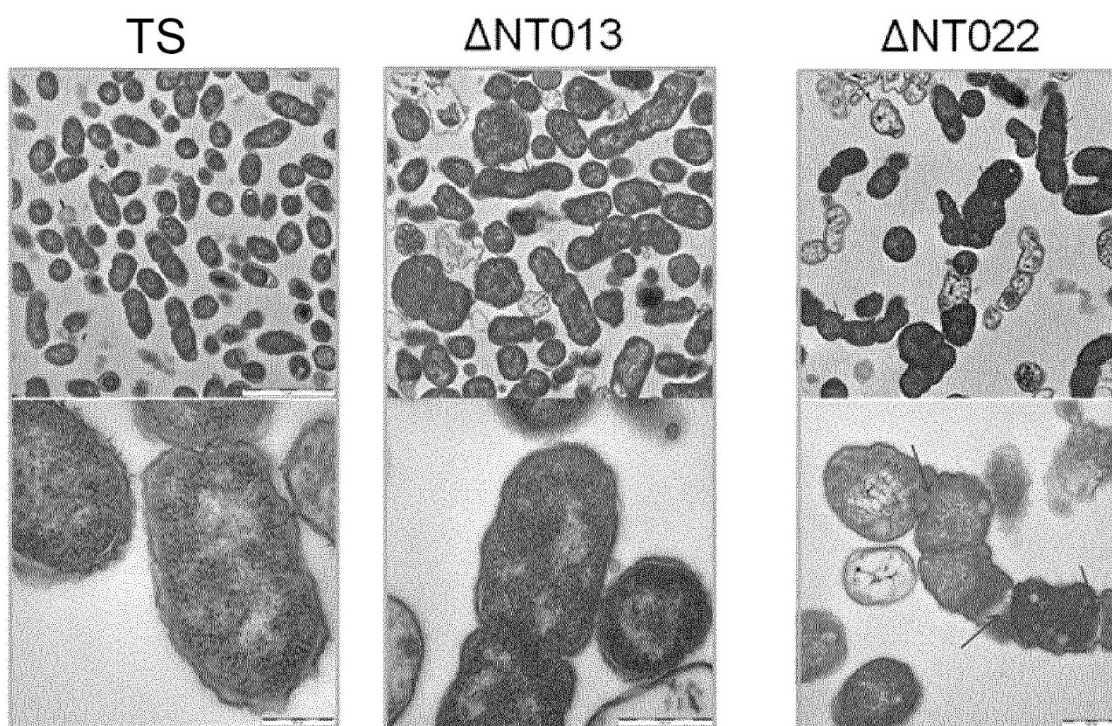
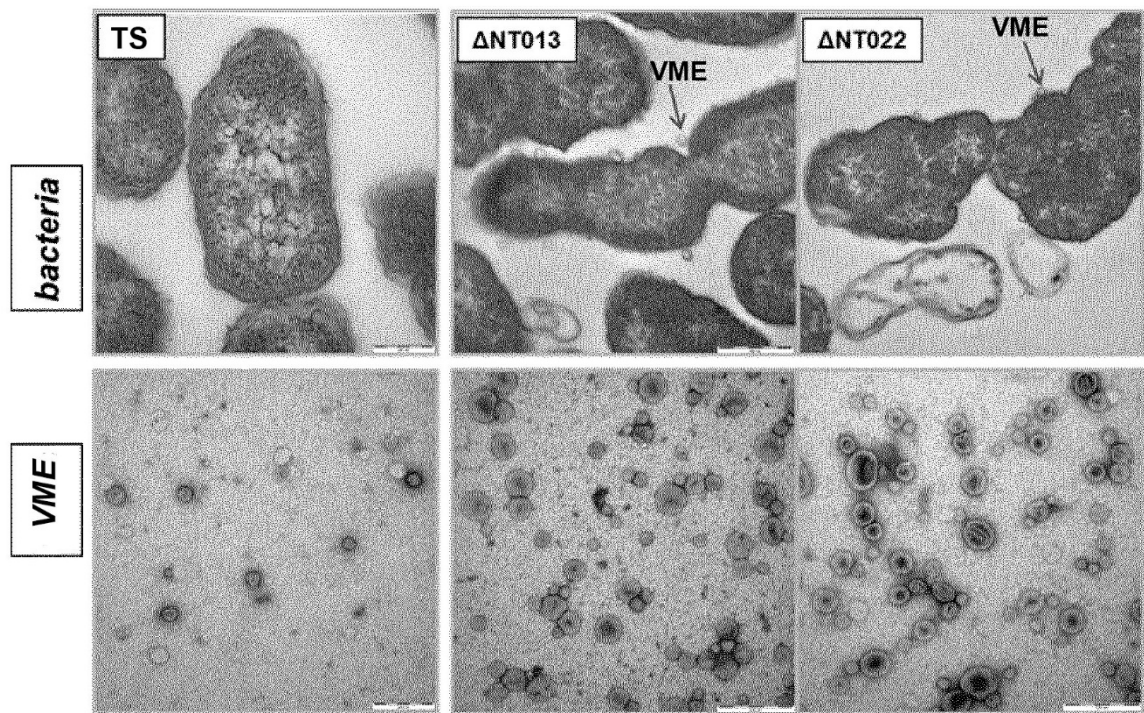


Figura 5



Sobreproducción de VME

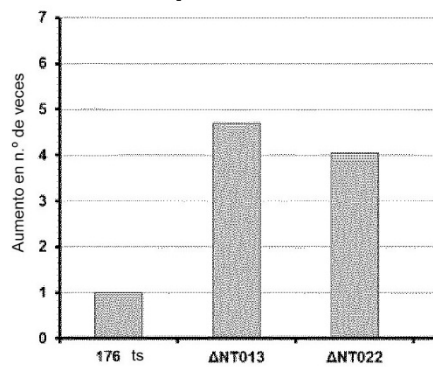


Figura 6

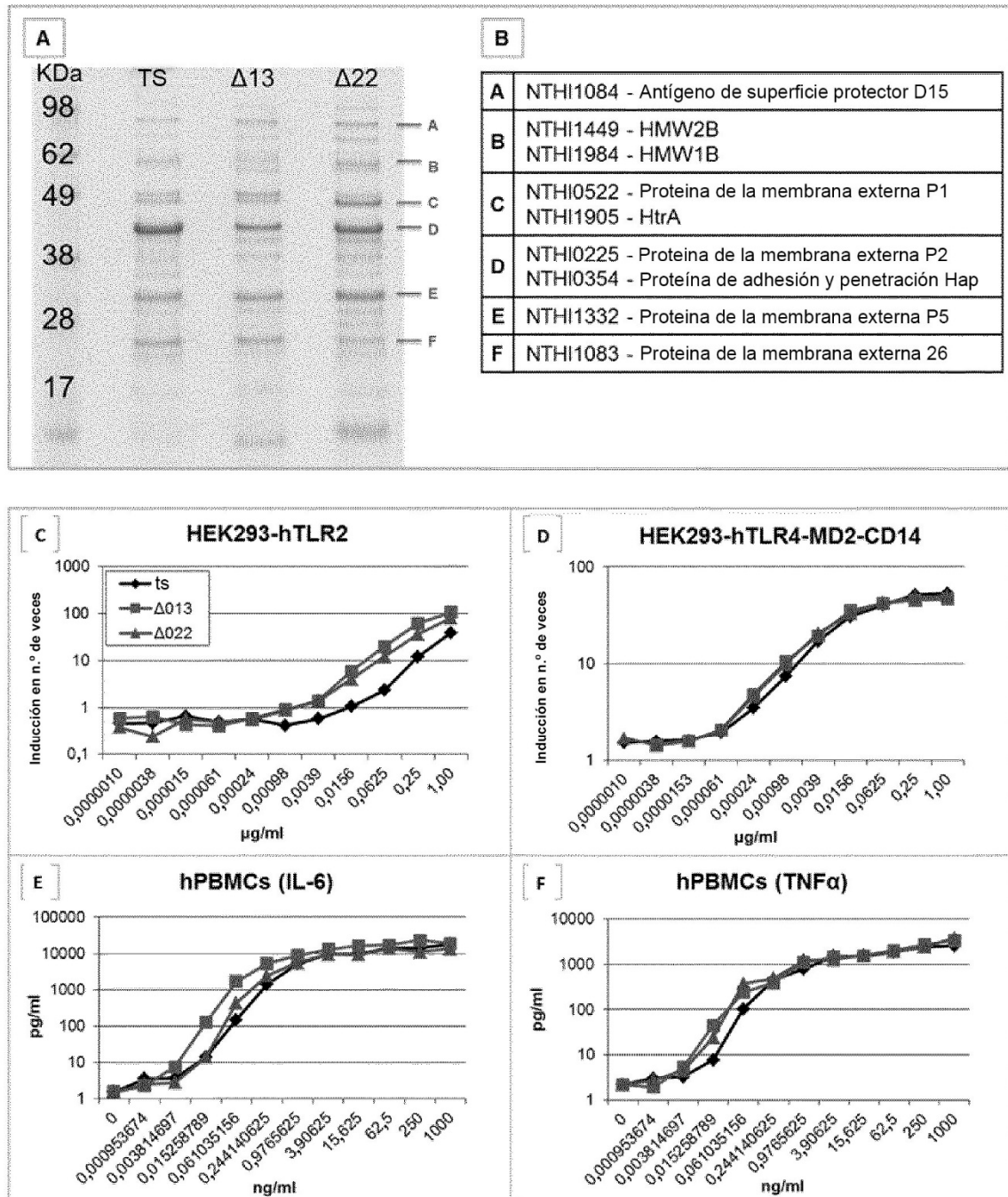
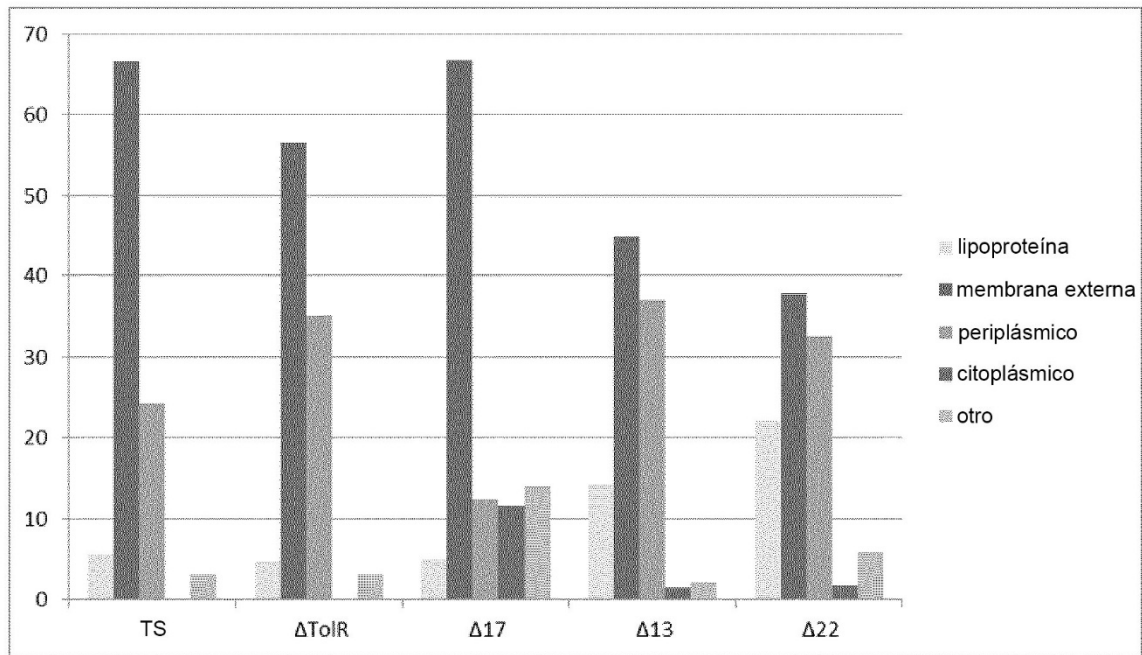


Figura 7



	TS	ΔTolR	Δ17	Δ13	Δ22
lipoproteína		=	=	++	++
membrana externa		-	=	--	--
periplásmico		+	--	+	+
citoplásmico		=	+	=	=
otro		=	+	=	=

Figura 8

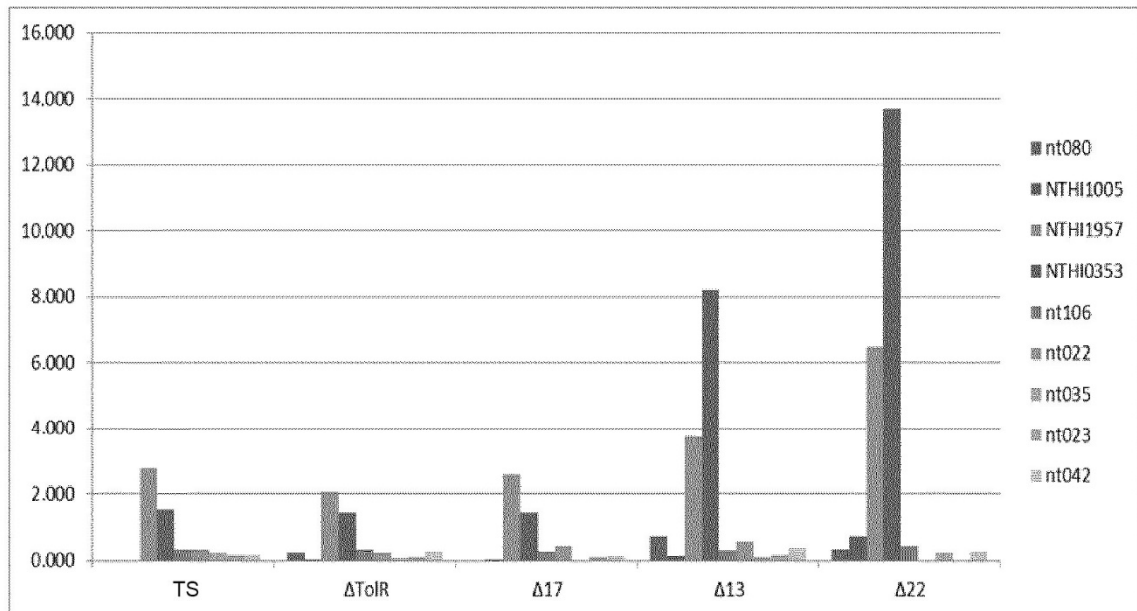


Figura 9

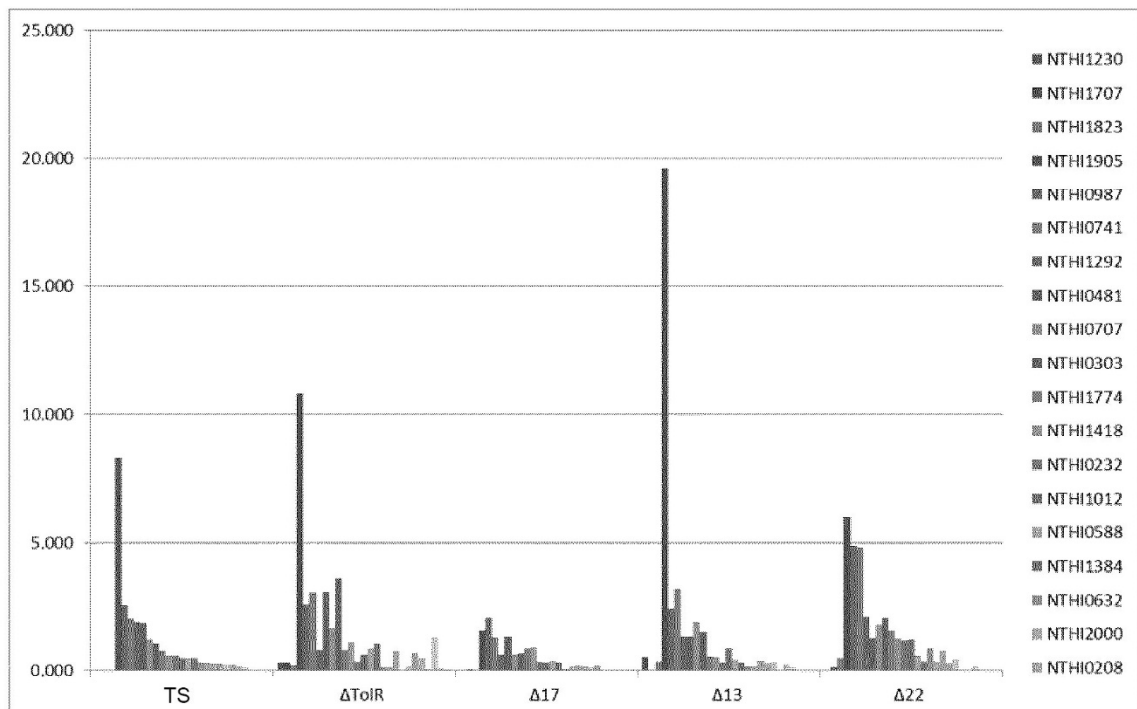


Figura 10

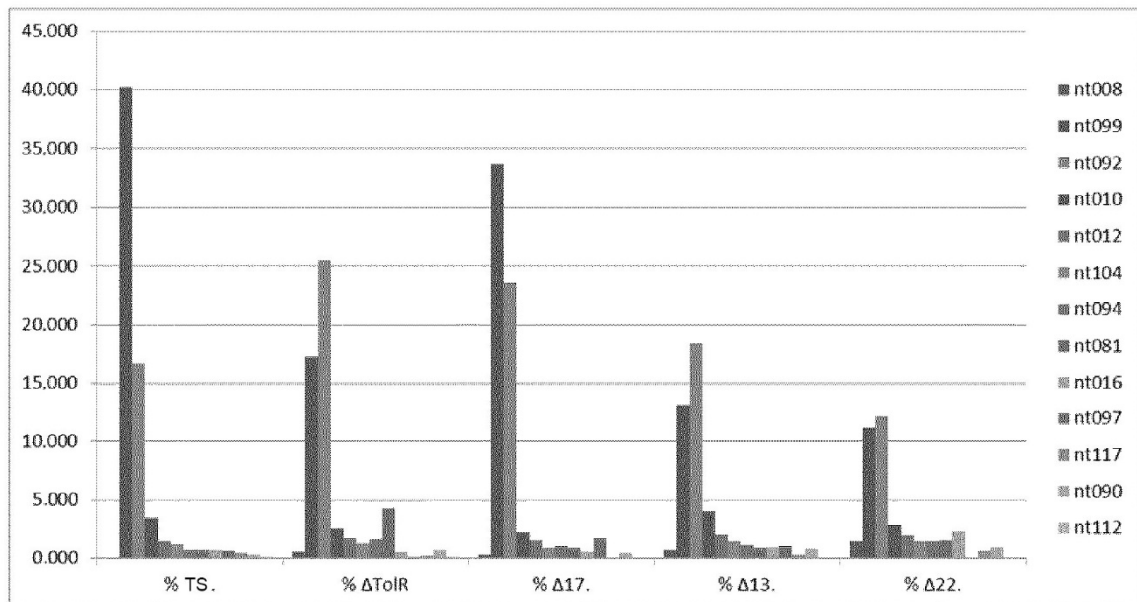


Figura 11

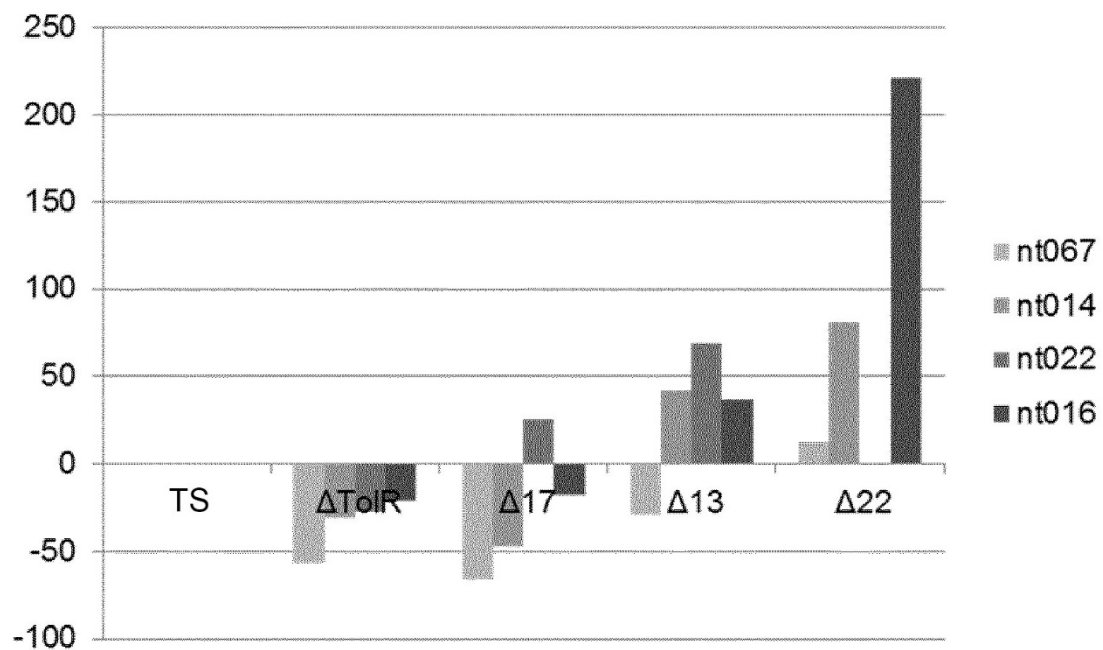


Figura 12

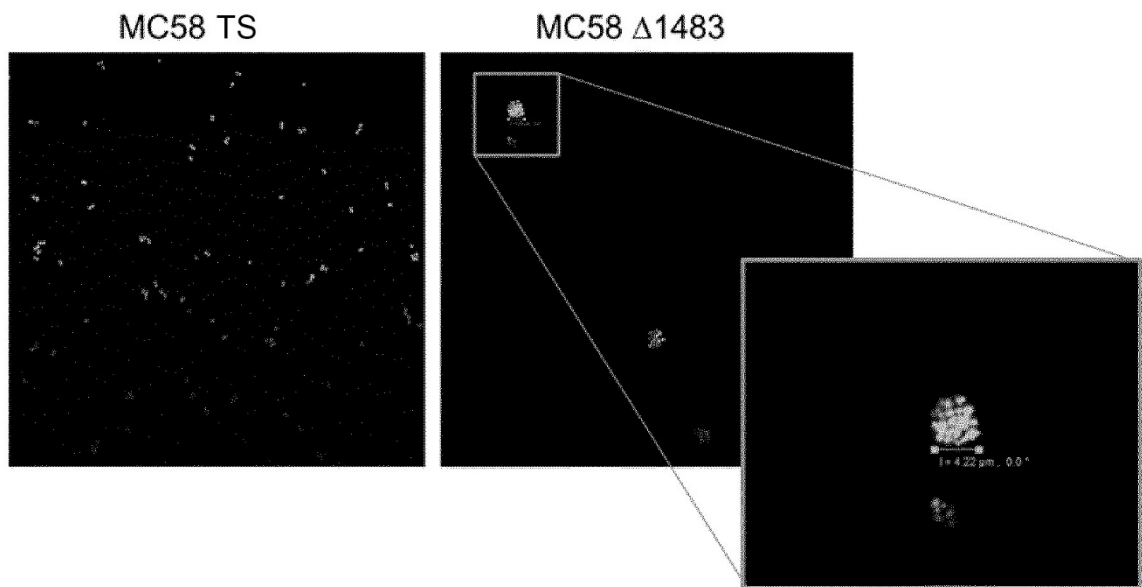


Figura 13

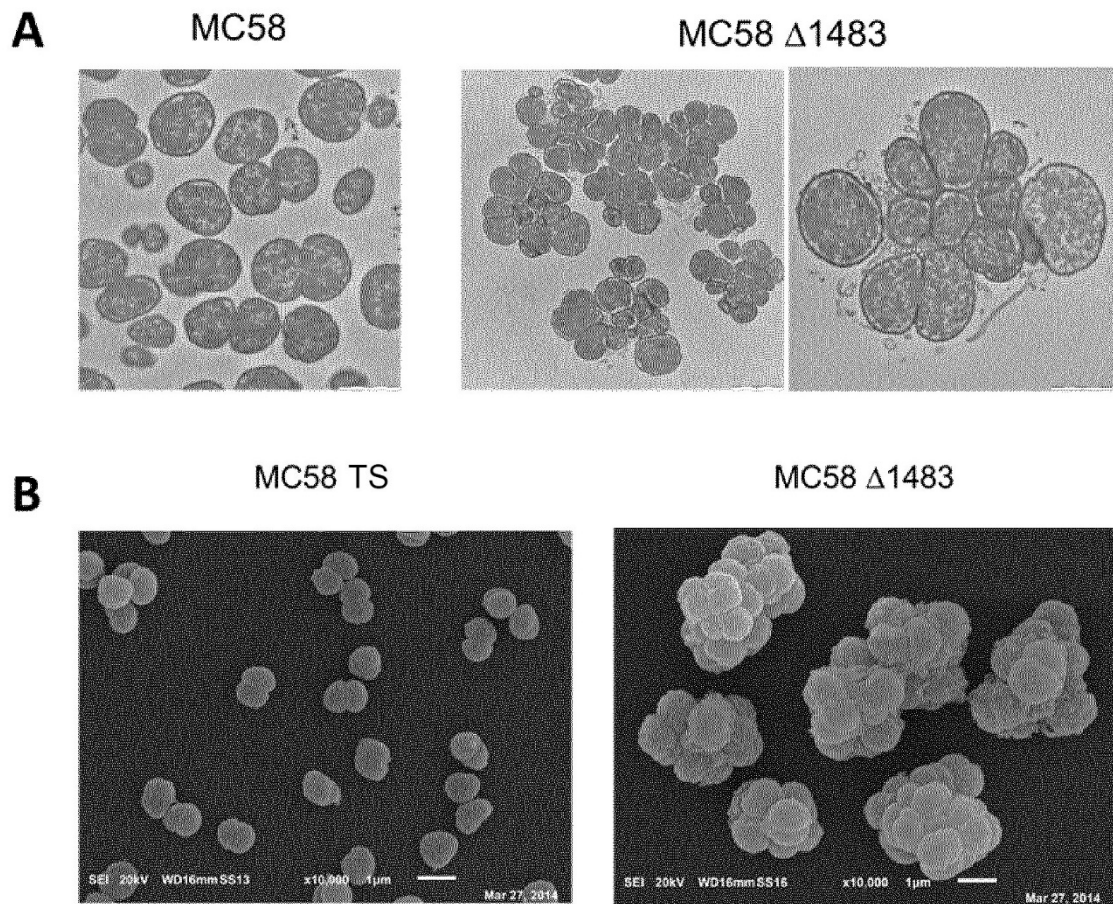


Figura 14

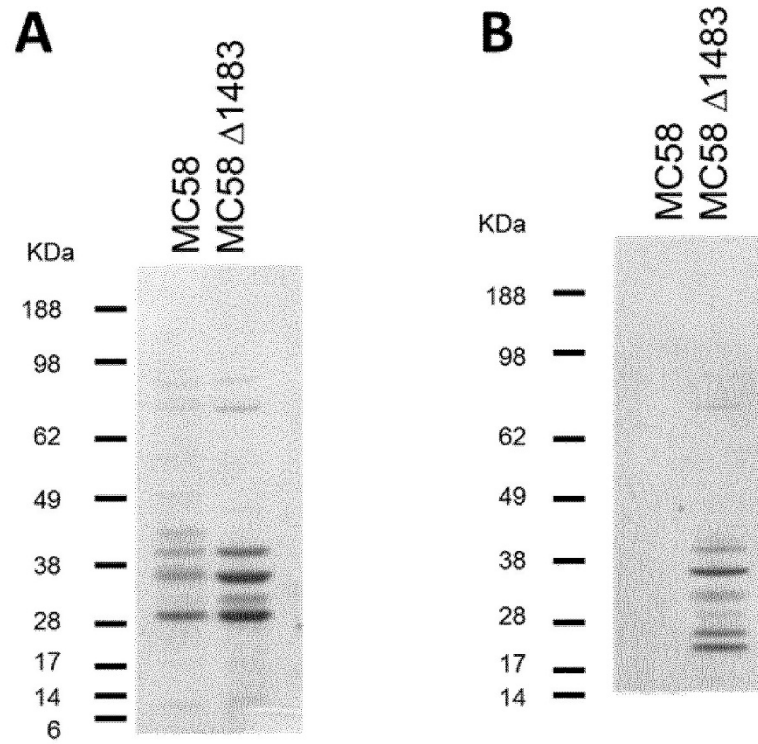
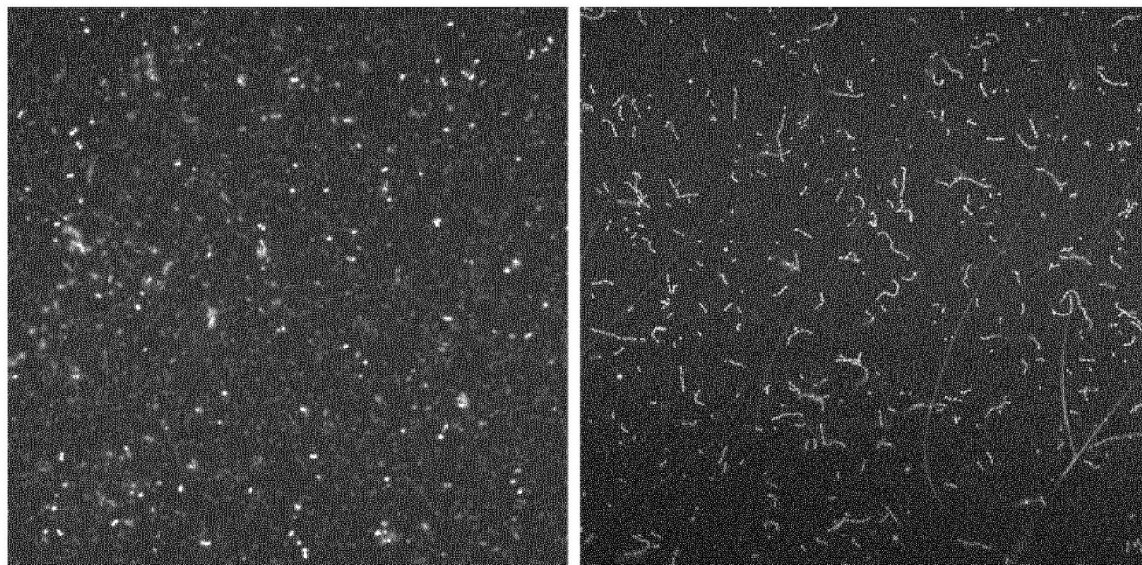


Figura 15



Bp W28 9G/129K

Bp W28 9G/129K Δ NlpD

97

Figura 17

```

E.coli      MQ-----QIARSVALAFN---NLPRPHRVMLGSLTVLT--LAVAV-WRPYVYHRDA
NTHi       -----MPVQHVKLARD---RRKKRTYIKVGVEFFVAILLILTGI--LLTIKDKSEE
N.meningitidis -----MAVF--ELSAKHKRYA--LRALAVSIIL--VSAAYIAS-----
B.pertussis MNRGPNLSVRSFKRKVAALFAPPVEPTSRGGALLRRTLTVSALGLFAGAAALGM-----
               :           : *       ..

E.coli      TPIVKTIELEQ-----N-EIRSLLPEAS-----EPIDQ---AAQEDEAIP
NTHi       NP1FSTSDSGEYHELNTSPNKNSTALQPEDATSYYDELQAKDDEVDEVKLSDDLGLTLP
N.meningitidis -----T-----ERTEVRVP
B.pertussis ---VQQ-----PDRSELPP
               *

E.coli      QD---EL-----D---DKIAGEAGVHEYVVSTGDTLSSILNQYIGDMGDITQLAAA---
NTHi       QHAQDALNGLLDAA---DQAIRITDQFSYTVTEGDTLKDVLVLSGLDDSSVQPLIKL---
N.meningitidis QRVQNLPLPSWGGSG---VQTAYWVQEAVQPGDSLADVLARSGMARDEIARITEKYGG
B.pertussis LRLIDSVLPLEAGQMVSADSNAPYISETRIRAGDTLAAVLQRLDIDSRLQNLTHDAS
               :           : **:* : * : :

E.coli      DKELRNLIKIGQQLSWTLTADGELQRLTWEVSRRET-----RTYDRTAANGFK-MTSEM
NTHi       DPELAHLKAGQQFYWILNKNDNLEYLNWLVSKEE-----RIYERLEDGKFK-RQVIE
N.meningitidis EADLRHLRADQSVHVLVGGDGGAREVQFFT-----DEDGERNLVALEK
B.pertussis ARSIYKLYPGRSVQAATNENGDLVWLRYIHTPGNESGGQVVRLLHVAPDGANGYKAEV
               . : * : .. : : :

E.coli      QQGEWVNLL-----KGTV-----GGSEFVASARNAGLTSAEVSAVIKAMQWQM-DERKL
NTHi       KKS1WRKEVL-----KGEI-----QNSLNSLREQGLDTRQSLNSALQWQV-SLRKL
N.meningitidis KGGIWRRSASEADMKVLPTLRVVKTSARGSLARAEVPVEIRESLSGIFAGRF-SLDGL
B.pertussis TQGTE-----QQTRVAVGTI-----RSSLFGATDAAGIPDSVIMQADILSSKIDFLRDL
               . :           : * . : : : : : *

E.coli      KKGDEFVLMSREMLDGKR-EQSLLGVRLRSEGKDYAIR-----AEDGKFYDRNGT
NTHi       KKGTFQFALLVSREYLGDKLTGQGNVEALRISGGKNYAVQ-----AANGRYYNQQGE
N.meningitidis KEGDAVRLMYDSLYFHGQQAAGDILAAEVVKGGRHQAFFYRSDEKGGGGGNYDEDEGK
B.pertussis RQGDQFRVVEVTRTHEGRYAGAGRVQALEFINGDKTYNAVWFS PD---GKSGSYDFDGT
               : * . : : : : : : * . : * : * :

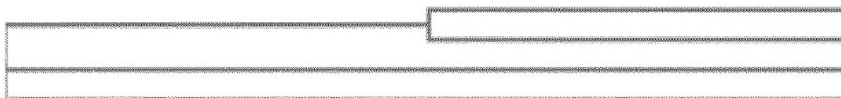
E.coli      GL--AKGFLRFPTAKQFRISSENFNPRRTNPVTGRVAPHRGVDFAMPQGTPLSVGDGEVV
NTHi       TL--GKGFAFYPLQARVSSPFNPNNRRHPVTGRVRPHKGVDFSVSQGTPTVIAPADGTVE
N.meningitidis VLQEKGGFNIEPL-VYTRISSPFGY-RMHPILHTWRLHTGTDYAAPQGTPTVRASADGVIT
B.pertussis SL--RGAEFLRTAL-KFSRISSTFGM-RMHP1HKTWTGHKGVDYAAAPTGTPIHATADGTVE
               * . * : * * * * : * : * : * : * : : * :

E.coli      -VAKRSGAAGYYVAIRHGRSYTTRYMHLRKIL--VKPGQVKRGDRIALSGNTGRSTGPH
NTHi       KVA1YQAGGAGRYVMLRHGREYQTVYMHLSKSL--VKAGQTVKKGERIALSGNTGISTGPH
N.meningitidis -FKGRKGGYGNAVMIRHANGVETLYAHLSAFSQA--EGNVRGGEVIGFVGSTGRSTGPH
B.pertussis -FAGWQNGYGNNV1IKHHGKYSTLYAHQSRIASGLKKGQK1AQGELVGYVGSTGWATGPH
               . . * * : * * * * : : * : . * * : * * :

E.coli      LHYEVWINQAVNPLTAKLPRT-GLTGSDRREFLAQAKEIVPQLRFD-----
NTHi       LHYEFRINGRAVNPLTVKLPGTSSGMTSAERKQLVRVREAEKMLKP-----
N.meningitidis LHYEARINGQPVNPVSVALPTPE-LTQA-DKAAFAAQKQKADALLARLGPVTVSQSD-
B.pertussis LHYEFVNNQPIDPLAVDLPPAR-KLEPAELRAFTQAVQPYKQK1KLLTEFQQTLPESGA
               * * * : * : : * : . * * : : * : : :

E.coli      -----
NTHi       -----
N.meningitidis -----
B.pertussis TVASR

```



E.coli 0,29785
 NTHi 0,28109
 N.meningitidis 0,33229
 B.pertussis 0,34241

Figura 18

N.meningitidis --MRYKPLLLALLMLLVFSTPAVAAHDAHAAHNSAEVKKQTKNKKKEQ
B.pertussis -----MRVAAGLLVWAAVAVAPPAWA-VSDLAGRQSE-----
E.coli MTRAVKPRRFAT--RPIIYASVLSAGVLLCAFSAHAD-----
NTHi -----MLRFGVNQKTSLLLTAALLSCGLLIFSPVS-----
: . : * : :
N.meningitidis EAAEGKKKEGKNGAVDKDKTGGKEAAKEGKESKKTAKNRKEAEKEATSRSQARKGREGDK
B.pertussis -----
E.coli -----
NTHi -----
N.meningitidis KSKAEHKKAHGKPVSGSKEKNAKTQPENKQGKKEAKGGNPRKGGKAEKDTVSANKKVR
B.pertussis -----AERQQAALRDRIDA-----
E.coli -----ERDQLKS-----
NTHi -----QSSDLNQ-----
: :
N.meningitidis DKNKGAVKQDKKYREEKNAKTDSDELKAAVAATNDVENKKALLKQSEGMLLHVSNSLKQ
B.pertussis -----LQKEIDTRE-----AARKEAADALKESESAISRINLRRLRELQ-----
E.coli -----IQADIAAKERAVRQ-----KQQQRASLLAQLKKQEEAISEATRKLRRETQNTLNQ
NTHi -----IQKQIKQKQESKIEK-----QKREQAKLQANLKKHESKINTVEGELLETEISLKE
: : : * : : : : * :
N.meningitidis LQEERIRQERIRQARGNLASVNRKQREAWDKFQKLNTELNRKTEVAA-----TKAQI
B.pertussis --E-----AS-----RKAEEAELAGLEKQVVAQQAQLKRRRAEL
E.coli LNK-----QI-----DEMNASIAKLEQQKAA-----QERSL
NTHi IRK-----QI-----ADADKQFKQLEKQERE-----QKARL
: : : : * : : : :
N.meningitidis SRFVSGNYKNSQPNNAVALFLKNAEPGQKNRFLRYTRYVNASNREVVKDKLEKQKALAVQE
B.pertussis ADQLRTQYTSGLSPWT-ALLSGDDPQQLGRNLGYLDYVSRAQAQAVHALREDIARLALQ
E.coli AAQLDAARFQGEHTGILQLILSGEESQRGQRLQAYFGYLNQARQETIAQLKQTRREEVAMQ
NTHi AKQMDIIYRSGINPSLIERMFAQDPTKAERMKVYVYQHLNQVRIEMIDLNAKTQQAQIAVQK
: : : : : * : : : : : * : : : :
N.meningitidis QKINNELARLKKIQANVQSLKKQGVTDAAEQ-----TESRRONAKIAKDARKLLEQK
B.pertussis GQADARRD-----DIQTLVAETSQKAALVEQKTRATLLAKLEGGQIAQRAEAGKLQ
E.coli AELEEKQS-----EQOTLLYEQAQQAQKLQALNERKKTLAGLESSIQGGQQQLSELQ
NTHi EAILAQKQ-----NHRNQLSTQKKQQQALQKAQQEHQSTLNELNKNLALDQDKLNALK
: : : : : : : : : : : : : : : :
N.meningitidis GNEQQLNKLKLSNLEKKKAEHRIQDA-----EAKRK
B.pertussis RDQRLSHLIDDLGSAIARQAEEDARRRAAEFARRKEEEARQAEAAARRAEARQQAARQ
E.coli ANESRLRN-----S IARA
NTHi ANEQALRQ-----ETQRA
: : . * : : : : : * : : : :
N.meningitidis LAEA-----RLAAAEKARKEAAQKA-----
B.pertussis AAAAREADARRQAEARQAQQAARDAEAARQEAARQAGRGFPVALADPDAAGLRQ
E.coli EAAAKA-----RAEREAREQAQVDR-QKEA-----
NTHi EQAARE-----QEKRE---REALAQKQKAE-----
* : : : * : : :
N.meningitidis -----EARRAE-MSNLTAEDRNIQAPSVMGIGSADGFSRMQGRLLKPPVDG
B.pertussis VEGGRLVDPQAAPPRETRPAARAEPAEAPPREAAPARTASAAPVGGGNGLRRLGPMVVRG
E.coli -----TRK-----GITYKPTSE-----KSLMSRTGGLGAPRGQAFWPVRG
NTHi -----KRT-----SKPYQPTVQE-----RQLINSTGLGAACKQYSLPVSQ
* : : * : : * : : * :
N.meningitidis VPTGLFGQNRSGGDIWKGVEYSTAP-ATVESIAPGTVSAYDELGDYKGVVVDHGENYIS
B.pertussis TIQGRFGVDRPDGGVVRGLYLRTAEAGTPVKVVAAPGTVVYAEWLRGFGNLIIVDHGQQYLT
E.coli PTLHRYGEQLQSELWKGMYIGASEGTEVKAIDGRVILADWLQGYGLVWVEHGKGDMS
NTHi SILHTFGSIQAGEVWKGMYIGASAGTPVKAIAAGRVILAGYLNQGYGYMVIVKHGETDLS
: * : : : : * : : : : : * : : : :
N.meningitidis IYAGLSEISVKGMYMAAGSKIGSSGSL-PDGEEGLYLQIRYQGVVNLNPSWIR-
B.pertussis VYAYNQSLLRKVRDRAAGDTIATVGATGGQVESGLYFEIRHRGAPVDPQAQWLAQ
E.coli LYGYNQSALVSVGSQVRAGQPIALVGSGGQGRPSLYFEIRRQGAQVNPQPWLG
NTHi LYGFNQAVSVKQGLVLSAGQVIAQVNTGEISRSALYFGISRKGTTPVNPAGWVR-
: * : : : * : : : : * : : : : * : : : : *

N.meningitidis 0,39328
B.pertussis 0,32748
E.coli 0,29673
NTHi 0,30918

Figura 19

