



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 356 077**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/195 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06800001 .7**

(96) Fecha de presentación : **05.07.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1904519**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

(54) Título: **Vacuna quimérica para una enfermedad inducida por *Haemophilus influenzae*.**

(30) Prioridad: **08.07.2005 US 697642 P**
19.05.2006 US 801835 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.04.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.04.2011

(73) Titular/es: **Nationwide Children's Hospital, Inc.**
700 Children's Drive
Columbus, Ohio 43205, US

(72) Inventor/es: **Bakaletz, Lauren, O. y**
Munson, Robert, S., Jr.

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 356 077 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

CAMPO DE LA INVENCION

La invención descrita en la presente memoria se refiere a una proteína quimérica que comprende la proteína de subunidad principal de pilus contráctil (PilA) de NTHi que presenta una parte de la proteína OMP P5 de NTHi. La invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden la proteína quimérica y procedimientos para provocar una respuesta inmunitaria utilizando las proteínas quiméricas de la invención.

ANTECEDENTES

El término clínico para las infecciones del oído medio es otitis media (OM). Según Klein, Vaccine, 19 (Supl. 1): S2-S8, 2000, la OM es el motivo más común para que un niño enfermo reciba atención médica y para que un niño en los Estados Unidos reciba antibióticos o se someta a una anestesia general. Las estadísticas indican que 24,5 millones de visitas a la consulta del médico se realizaron por OM en 1990, lo que representa un aumento superior al 200% con respecto a las notificadas en la década de 1980. Aunque en pocas ocasiones va asociada con mortalidad, la morbilidad asociada con la OM es significativa. La pérdida de audición es un problema común asociado con esta enfermedad, afectando a menudo al comportamiento, a la educación y al desarrollo de las habilidades lingüísticas del niño (Baldwin, Am. J. Otol., 14: 601-604, 1993; Hunter *et al.*, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Supl., 163: 59-61, 1994; Teele *et al.*, J. Infect. Dis., 162: 685-694, 1990). El impacto socioeconómico de la OM también es grande, con costes directos e indirectos de diagnóstico y tratamiento de la OM que superan los 5 mil millones de \$ anualmente sólo en los US (Kaplan *et al.*, Pediatr. Infect. Dis. J., 16: S9-11, 1997).

Se cree que la OM es el resultado de factores infecciosos, ambientales y genéticos del huésped. Bacterias tales como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis* son los organismos infecciosos más comunes en la OM. La OM aguda es una enfermedad caracterizada por una rápida aparición y una corta duración de signos y síntomas de inflamación en el oído medio, mientras que la OM crónica se refiere a un estado que se define por la presencia relativamente asintomática de líquido (o efusión) en el oído medio. Sin embargo, en la OM crónica, a pesar de la ausencia de ciertos signos de infección aguda (es decir, dolor de oídos o fiebre), estos fluidos anómalos del oído medio pueden persistir durante periodos que superan los tres meses. El tratamiento de la OM aguda mediante terapia con antibióticos es común, pero han surgido múltiples bacterias resistentes a los antibióticos en los tres géneros de bacterias responsables de la OM. El tratamiento quirúrgico de la OM crónica implica la inserción de tubos de timpanostomía a través de la membrana timpánica del oído mientras el niño está bajo anestesia general. Aunque este procedimiento es común (las tasas de prevalencia son de ~1 millón de tubos insertados al año en US Bright *et al.*, Am. J. Public Health, 83(7): 1026-8, 1993) y es sumamente eficaz en cuanto a aliviar los síntomas dolorosos drenando los líquidos acumulados en el oído medio, es invasivo y conlleva riesgos importantes (Berman *et al.*, Pediatrics, 93(3):353-63, 1994; Bright *et al.*, citado anteriormente; Cmons, ASM News, 60: 527-528; Paap, Ann. Pharmacother., 30(11): 1291-7, 1996). Resultan por tanto necesarios otros enfoques para el tratamiento y, preferentemente, la prevención de la OM.

El desarrollo de una vacuna contra la OM está más avanzado para *S. pneumoniae*, el agente causante principal de la OM aguda (OMA), tal como demuestra la reciente aprobación y autorización de una vacuna de conjugado capsular heptavalente, PREVNAR® (Eskola y Kilpi, Pediatr. Infect. Dis. J. 16: S72-78, 2000). Aunque PREVNAR® ha sido sumamente eficaz para la enfermedad neumocócica invasiva, la cobertura para la OM ha sido decepcionante (6-8%) con notificaciones de un número aumentado de casos de OM debido a serotipos no incluidos en la vacuna (Black *et al.*, Pediatr. Infect. Dis. J., 19: 187-195, 2000; Eskola *et al.*, Pediatr. Infect. Dis. J., 19: S72-78, 2000; Eskola *et al.*, N. Engl. J. Med., 344: 403-409, 2001; Snow *et al.*, Otol. Neurotol., 23: 1-2, 2002).

La *H. influenzae* es una bacteria gram-negativa que, tal como se indicó anteriormente, desempeña un papel en la OM. Los aislados clínicos de *H. influenzae* se clasifican o bien como serotipos "a" a "f" o como no tipificables dependiendo de la presencia o ausencia, respectivamente, de cápsulas de polisacárido específicas del tipo en las bacterias. Se ha desarrollado una vacuna contra *H. influenzae* tipo b. Como PREVNAR®, las vacunas contra *H. influenzae* tipo b se dirigen a la cápsula de polisacárido de este organismos y por tanto la vacuna está compuesta por un polisacárido capsular que se ha conjugado con un portador proteico. Ni PREVNAR® ni la vacuna contra *H. influenzae* tipo b presentan ninguna eficacia para las enfermedades del aparato respiratorio inducidas por NTHi, incluyendo la OM. Se han realizado menos avances para una vacuna contra *H. influenzae* no tipificable (NTHi) que provoca aproximadamente el 20% de la OM aguda en niños y predomina en la OM crónica con efusión (Coleman *et al.*, Inf and Immunity, 59(5), 1716-1722, 1991; Klein, Pediatr. Infect. Dis. J., 16, S5-8, 1997; Spinola *et al.*, J. Infect. Dis., 154, 100-109, 1986). La NTHi también puede provocar neumonía, sinusitis, septicemia, endocarditis, epiglottitis, artritis séptica, meningitis, infecciones puerperales y neonatales, sepsis puerperal y neonatal, salpingitis aguda y crónica, pericarditis, celulitis, osteomielitis, endocarditis, colecistitis, infecciones intraabdominales, infección de las vías urinarias, mastoiditis, infección de injerto aórtico, conjuntivitis, fiebre purpúrica brasileña, bacteriemia oculta y exacerbación de enfermedades pulmonares subyacentes tales como bronquitis crónica, bronquiectasia y fibrosis quística. Un aislado de NTHi prototipo es el aislado con número de pases bajo 86-028NP que se recuperó de un niño con OM crónica. Esta cepa se ha caracterizado bien *in vitro* (Bakaletz *et al.*, Infect. Immun., 53: 331-5, 1988; Holmes *et al.*, Microb. Pathog., 23: 157-66, 1997) así como en modelos de OM de chinchilla (Bakaletz *et al.*, Vaccine, 15: 955-61, 1997; Suzuki *et al.*, Infect. Immun., 62: 1710-8, 1994; DeMaria *et al.*, Infect. Immun., 64: 5187-92, 1996). La cepa 86-026N de NTHi se depositó en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, el 16 de octubre de 2001 y se le

asignó el nº de registro PTA-4764. Puede encontrarse un conjunto de secuencias contiguas del genoma de la cepa 86-028NP en la página web del Columbus Children's Research Institute Center for Microbial Pathogenesis.

La adherencia y colonización se reconocen como las primeras etapas en la patogénesis de enfermedades inducidas por *H. influenzae*. Como tal, *H. influenzae* expresa múltiples adhesinas que incluyen adhesinas no fimbriales, fimbrias y pili hemaglutinantes (Gilsdorf *et al.*, *Pediatr Res* 39, 343-348, 1996; Gilsdorf, *Infect. Immun.*, 65, 2997-3002, 1997; y St. Geme III, *Cell. Microbiol.*, 4, 191-200, 2002). Particularmente, ninguna de las adhesinas descritas se ha asociado previamente con una función de motilidad. Además, *H. influenzae* no expresa flagelos que también están asociados con la motilidad. La motilidad contráctil es una forma independiente de los flagelos de traslocación bacteriana sobre superficies húmedas y se produce mediante extensión, atado y después retracción de estructuras polares conocidas como pili de tipo IV (Bardy, *Microbiology*, 149, 295-304, 2003; Tonjum y Koomey, *Gene*, 192, 155-163, 1997; Wolfgang *et al.*, *EMBO J.*, 19, 6408-6418; Mattick, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 289-314, 2002). Los pili de tipo IV presentan normalmente 5-7 nm de diámetro, varios micrómetros de longitud y están compuestos por una única subunidad de proteína ensamblada en una conformación helicoidal con ~5 subunidades por vuelta (Bardy *et al.*, *Microbiology*, 149, 295-304, 2003; Wall y Kaiser, *Mol. Microbiol.*, 32, 1-10, 1999). Las subunidades de pilina de tipo IV presentan habitualmente 145-160 aminoácidos de longitud y pueden estar glicosiladas o fosforiladas. Existen dos clases de subunidades de pilina, tipo IVa y tipo IVb, que se distinguen entre sí por la longitud promedio del péptido líder y la subunidad madura, cuyo aminoácido N-metilado ocupa la posición N-terminal de la proteína madura, y la longitud promedio de la región D (para región disulfuro). La mayoría de los patógenos respiratorios expresan pilinas de clase IVa, mientras que los enteropatógenos expresan más normalmente pilinas de clase IVb. Los pili de tipo IVa se distinguen por la presencia de una fenilalanina metilada N-terminal hidrófoba, sumamente conservada.

Los pili de tipo IV actúan como medios de traslocación rápida sobre, y colonización de, nuevas superficies. Por tanto la expresión de pilus de tipo IV es importante tanto para la adherencia como para la formación de biopelículas por parte de muchas bacterias (Mattick, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 289-314 2002; O'Toole y Kolter, *Mol. Microbiol.*, 30, 295-304, 1998; Klausen *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 50, 61-68, 2003; Jesaitis *et al.*, *J. Immunol.*, 171, 4329-4339, 2003), así como la virulencia de especies de *Neisseria*, *Moraxella bovis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enteropatógena y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (O'Toole y Kolter, citado anteriormente; Klausen *et al.*, citado anteriormente; Klausen *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 48, 1511-1524, 2003; Strom y Lory, *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 565-596, 1993). Una biopelícula es una organización compleja de bacterias que se anclan a una superficie a través de una matriz extruida por bacterias, compuesta por exopolisacárido u otras sustancias. La matriz envuelve las bacterias y las protege frente al sistema inmunitario humano. Ehrlich *et al.*, *JAMA*, 287(13), 1710-1715 (2002) describen la formación de biopelículas por *H. influenzae*. Se ha postulado que el bloqueo de la interacción entre pili de tipo IV y el cuerpo humano puede evitar o detener la infección bacteriana (Meyer *et al.*, patente US nº 6.268.171 publicada el 31 de julio de 2001).

La expresión de pilus de tipo IV es una función bacteriana compleja y sumamente regulada. En *P. aeruginosa*, la biogénesis y la función de los pili de tipo IV están controladas por más de cuarenta genes (Strom y Lory, citado anteriormente). Hasta la fecha, sólo se ha encontrado un subconjunto del amplio número de genes de pilus de tipo IV relacionados (Tonjum y Koomey, citado anteriormente; Darzins y Russell, *Gene*, 192, 109-115, 1997) en varios miembros de la familia HAP (*Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*) (Stevenson *et al.*, *Vet. Microbiol.*, 92, 121-134, 2003; Doughty *et al.*, *Vet. Microbiol.*, 72, 79-90, 2000; Dougherty y Smith, *Microbiology*, 145, 401-409 1999), pero hasta ahora nunca se ha descrito ni la expresión de pili de tipo IV ni la motilidad por contracción para ningún aislado de *H. influenzae*. De hecho, *H. influenzae* se describe tradicionalmente como una bacteria que no expresa estas estructuras (Friedrich *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3695-3700, 2003; Fussenegger *et al.*, *Gene*, 192, 125-134, 1997), a pesar de la presencia de una agrupación de genes crípticos dentro del genoma de la cepa Rd (Fleischmann *et al.*, *Science*, 269, 496-512, 1995). La cepa Rd es un derivado no encapsulado de un organismo de serotipo d de *H. influenzae* (Zwahlen *et al.*, *Infect. Immun.*, 42, 708-715, 1983; Bendler y Goodgal, *J. Microbiol.*, 70, 411-422, 1972; Risberg *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 261, 171-180, 1999). Aunque la cepa Rd presenta algunas propiedades de virulencia, se considera generalmente que las cepas de serotipo d son comensales; no provocan frecuentemente enfermedad (Daines *et al.*, *J. Med. Microbiol.*, 52, 277-282, 2003). Por tanto es importante distinguir entre cepas de *H. influenzae* que provocan enfermedad y la cepa Rd.

Las fimbrias, que son apéndices superficiales que se encuentran en *Haemophilus influenzae* no tipificable, se producen por el 100% de las bacterias recuperadas de los oídos medios y la región nasofaríngea de niños con otitis media crónica. Se desarrolló previamente una vacuna compuesta por fimbrina, una proteína filamentosa derivada de las fimbrias de *Haemophilus influenzae* no tipificable y es útil para estudiar, prevenir o reducir la gravedad de la otitis media. Sin embargo, las metodologías existentes para aislar proteína fimbrina a partir de la membrana externa bacteriana son tediosas y requieren mucho tiempo. De manera similar, la purificación de fimbrina expresada por el gen de fimbrina en otro vector huésped también es tediosa debido a la homología entre la proteína fimbrina y las proteínas de membrana externa del vector huésped.

El candidato de vacuna quimérica sintético, designado como LB1 y descrito en la patente US nº 5.843.464, ha mostrado una eficacia enorme en múltiples ensayos preclínicos de vacunas en dos huéspedes roedores. Este péptido sintético comprende un epítipo de células B de fimbrina P5 sintetizado de manera colineal con epítipo promiscuo de células T derivado de una proteína de fusión de la vacuna contra el sarampión. Aunque el péptido LB1 ha demostrado ser eficaz en ensayos preclínicos, existe preocupación sobre la capacidad para someter a prueba y comercializar una vacuna que contenga un epítipo promiscuo de células T para una utilización pretendida en niños muy pequeños. Por

tanto, existe la necesidad de desarrollar un candidato de vacuna que provoque una respuesta inmunitaria específica y controlada frente a *H. influenzae*.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a proteínas quiméricas que comprenden una parte de la proteína de subunidad principal de pilus de tipo IV (PilA) de *H. influenzae* no tipificable (NTHi) y una parte de la proteína OMP P5 de NTHi (también denominada fimbrina P5, fimbrina o adhesina homóloga a OMP P5). En particular, la invención proporciona proteínas quiméricas que comprenden PilA modificada para presentar el epítipo de células B del péptido LB1. Por tanto, según un aspecto de la presente invención se proporciona una proteína quimérica que comprende una parte de proteína PilA de *H. influenzae* no tipificable (NTHi) (SEC ID nº: 2) y una parte de los péptidos LB1 (SEC ID nº: 53). La invención proporciona asimismo composiciones que comprenden una o más proteínas quiméricas de la invención y su utilización para provocar una respuesta inmunitaria.

10 El péptido LB1 es un péptido derivado de fimbrina P5 quimérico sintético de 40 aminoácidos (SEC ID nº: 53) que induce una respuesta inmunogénica frente a NTHi y es ventajoso porque no requiere técnicas de purificación tediosas. El péptido LB1 comprende un péptido de 19 aminoácidos N-terminal que es un epítipo de células B (SEC ID nº: 4). El epítipo de células B se derivó del bucle 3 expuesto en superficie atribuido de una proteína de membrana externa (fimbrina) de NTHi designada como OMP P5 (también denominada fimbrina P5 o adhesina homóloga a OMP P5). El péptido LB1 comprende además un péptido conector 5-mero corto y un epítipo promiscuo de células T de 16 residuos. El epítipo de células T se derivó de una proteína de fusión del virus del sarampión. El epítipo promiscuo de células T induce una respuesta de células T muy intensa en individuos expuestos a este epítipo.

20 La presente invención comprende insertar una parte o fragmento del péptido LB1 en una proteína portadora más segura y selectiva que no reduzca la eficacia de inducir una respuesta de células B. Preferentemente, la parte del péptido LB1 está insertada en un portador que por sí mismo también confiere protección frente a enfermedades inducidas por NTHi. Un portador de este tipo que puede inducir protección frente a enfermedades inducidas por NTHi es la proteína que comprende la proteína de pilus de tipo IV (pilus contráctil) de NTHi, también conocida como proteína PilA (SEC ID nº: 2). La proteína PilA está codificada por el gen *pilA* (SEC ID nº: 1).

25 La presente invención proporciona proteínas quiméricas que comprenden una parte del péptido LB1 con el fin de presentar el péptido para que induzca una respuesta inmunogénica. La invención comprende presentar una parte del péptido LB1 que presente de 12 a 35 aminoácidos, más preferentemente presentar una parte del péptido LB1 que presente de 15 a 30 aminoácidos, y todavía más preferentemente presentar una parte del péptido LB1 que presente de 18 a 19 aminoácidos y sea una subunidad de la proteína fimbrina. Una parte preferida del péptido LB1 es la secuencia de aminoácidos N-terminal RSDYKFYEDANGTRDHKKG (SEC ID nº: 4).

30 En otra forma de realización, la invención proporciona una proteína quimérica en la que la proteína PilA se modifica para presentar un péptido de 24 aminoácidos. El péptido de 24 aminoácidos puede comprender el epítipo de células B del péptido LB1 modificado como se expone en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5 (LVRSYKFYEDANGTRDHKKGRHT) en la que se añaden una leucina y una valina al extremo N-terminal del epítipo de células B de LB1 y una arginina, una histidina y una treonina están en el extremo C-terminal del epítipo de células B de LB1. Estas modificaciones al epítipo de células B se contemplan para ayudar en el plegado de la proteína y/o la presentación de antígenos. La invención comprende además cualquier modificación respecto al epítipo de células B de LB1 que ayude en el plegado de la proteína y/o la presentación de antígenos.

40 La secuencia de aminoácidos del bucle 3 expuesto en superficie de OMP P5 de NTHi puede variar entre cepas de NTHi. La invención comprende proteínas quiméricas que comprenden una parte de la proteína PilA modificada para presentar el epítipo de células B de cualquier secuencia de aminoácidos variante del bucle 3 de la OMP P5 de NTHi. En particular, la invención proporciona proteínas quiméricas en las que la proteína PilA se modifica para presentar una de las siguientes secuencias de aminoácidos de OMP P5 de NTHi variantes: RSDYKLYNKSSNSTLKNLGE (SEC ID nº: 6), RSDYKLYNKSSSTLKDGE (SEC ID nº: 7) y RSDYKFYDNKRID (SEC ID nº: 8). Los péptidos variantes también pueden presentarse con una leucina y una valina añadidas al extremo N-terminal y una arginina, una histidina y una treonina añadidas al extremo C-terminal o cualquier otra modificación para ayudar en el plegado de la proteína y/o la presentación de antígenos.

50 Las proteínas quiméricas de la invención comprenden los aminoácidos de PilA modificados en las que se han sustituido los aminoácidos de PilA nativos por una parte del péptido LB1. Además, las proteínas quiméricas de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos de PilA modificados en cuyo interior está insertada una parte del péptido LB1 y además de los aminoácidos PilA nativos. Las proteínas quiméricas de la invención presentan la capacidad de inducir la formación de anticuerpos dirigidos frente a dos proteínas y por tanto son candidatos de vacuna más eficaces y más específicos.

55 En una forma de realización, las proteínas quiméricas comprenden la secuencia de aminoácidos madura (residuos 13-149) de la proteína PilA de NTHi (SEC ID nº: 2) en la que una parte del péptido LB1 está insertada entre los residuos de cisteína en las posiciones 62 y 72 de SEC ID nº: 2 y puede sustituir a los aminoácidos nativos, tal como la proteína quimérica que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 54. Esta proteína quimérica comprende los

residuos 40-149 de SEC ID nº: 2 y presenta el epítipo de células B de LB1 (SEC ID nº: 5) insertado entre los residuos 62 y 72 de SEC ID nº: 2. En otra forma de realización, la parte del péptido LB1 está insertada entre los residuos de cisteína en las posiciones 131 y 144 de SEC ID nº: 2 y puede sustituir a los aminoácidos nativos tal como la proteína que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 55. Esta proteína quimérica comprende los residuos 40-149 de SEC ID nº: 2 y presenta el epítipo de células B de LB1 (SEC ID nº: 5) insertado entre los residuos 131 y 144 de SEC ID nº: 2.

En otra forma de realización, las proteínas quiméricas comprenden la secuencia de aminoácidos madura (residuos 13-149) de la proteína PilA de NTHi (SEC ID nº: 2) en la que la parte del péptido LB1 está insertada en el extremo C-terminal de la proteína PilA. Por ejemplo, la proteína quimérica de SEC ID nº: 56 comprende los residuos 40-149 de SEC ID nº: 2 y el epítipo de células B de LB1 (SEC ID nº: 5) está insertado tras el residuo 149 de SEC ID nº: 2.

En otra forma de realización, las proteínas quiméricas comprenden la secuencia de aminoácidos madura (residuos 13-149) de la proteína PilA de NTHi (SEC ID nº: 2) en la que la parte del péptido LB1 está insertada en el extremo N-terminal de la proteína PilA. Por ejemplo, la proteína quimérica de SEC ID nº: 57 comprende los residuos 40-149 de SEC ID nº: 2 y el epítipo de células B de LB1 (SEC ID nº: 5) está insertado antes del residuo 40 de SEC ID nº: 2.

En otra forma de realización, la invención proporciona proteínas quiméricas que comprenden una parte de la proteína PilA de NTHi y uno o más de los péptidos LB1 descritos en la presente memoria. Las proteínas quiméricas de la invención incluyen las que presentan el mismo péptido LB1 más de una vez dentro de una parte de la proteína PilA de NTHi y las que presentan dos o más péptidos LB1 diferentes dentro de una parte de la proteína PilA de NTHi.

Los polipéptidos y polinucleótidos de pilus de tipo IV (PilA) de NTHi de la invención

Las proteínas quiméricas de la invención pueden comprender la longitud completa o una parte de la subunidad principal del pilus de tipo IV de NTHi que se codifica por el gen *pilA*. La proteína PilA del aislado de 86-028NP de NTHi se codifica por la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEC ID nº: 2, que se describe en la publicación de patente US nº US 2005-018335. También se proporcionan polinucleótidos que codifican para polipéptidos PilA a partir de los aislados clínicos de NTHi 1728MEE, 1729MEE, 3224A, 10548MMEE, 1060MEE, 1885MEE, 1714MEE, 1236MEE, 1128MEE y 214NP. Las secuencias de aminoácidos de estos polipéptidos PilA se exponen en las SEC ID nº: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 y 52 respectivamente. La posibilidad de una utilización de codones alternativos se contempla específicamente en polinucleótidos que codifican para los polipéptidos. En una forma de realización, los polipéptidos se codifican respectivamente por las secuencias de nucleótidos expuestas en las SEC ID nº: 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 y 51.

La invención proporciona polinucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas con (a) el complemento de las secuencias de nucleótidos expuestas en las SEC ID nº: 1, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 y 51; (b) un polinucleótido que es una variante alélica de cualquier polinucleótido mencionado anteriormente; (c) un polinucleótido que codifica para una especie homóloga de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente; o (d) un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende un dominio o truncamiento específico de los polipéptidos de la presente invención. Están específicamente comprendidos los polinucleótidos PilA de otras cepas de *H. influenzae* no tipificables y de las cepas de *H. influenzae* a, b, c, e y f. Estos polinucleótidos pueden identificarse y aislarse mediante técnicas convencionales en la materia tal como hibridación y reacción en cadena de la polimerasa utilizando parte de, o todos, los polinucleótidos de SEC ID nº: 1, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 y 51 como sondas o cebadores, respectivamente.

Los polinucleótidos de la invención también incluyen secuencias de nucleótidos que son sustancialmente equivalentes a los polinucleótidos mencionados anteriormente. Los polinucleótidos según la invención pueden presentar, por ejemplo, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, o 89%, más normalmente por lo menos 90%, 91%, 92%, 93% o 94% e incluso más normalmente por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con los polinucleótidos de NTHi mencionados anteriormente.

Comprendidos dentro del alcance de las secuencias de ácido nucleico de la invención se encuentran fragmentos de secuencia de ácido nucleico que se hibridan en condiciones restrictivas con las secuencias de nucleótidos de NTHi de SEC ID nº: 1, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 y 51, o complementos de las mismas, fragmento que es mayor que aproximadamente 5 nucleótidos, preferentemente 7 nucleótidos, más preferentemente mayor que 9 nucleótidos y todavía más preferentemente mayor que 17 nucleótidos. Se contemplan fragmentos de, por ejemplo, 15, 17 ó 20 nucleótidos o más que son selectivos para (es decir, se hibridan específicamente con uno cualquiera de los polinucleótidos PilA de la invención). Estos fragmentos de secuencia de ácido nucleico que pueden hibridarse específicamente con un polinucleótido PilA de NTHi de la invención pueden utilizarse como sondas para detectar polinucleótidos PilA de NTHi de la invención y/o pueden diferenciar los polinucleótidos PilA de NTHi de la invención de otros genes bacterianos, y se basan preferentemente en secuencias de nucleótidos únicas.

El término "restrictivo" se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a condiciones que se entienden comúnmente en la materia como restrictivas. La restricción de hibridación se determina principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes tal como la formamida. Los ejemplos de

condiciones restrictivas para la hibridación y el lavado son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 65-68°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M, y formamida al 50% a 42°C. Véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989).

También pueden utilizarse condiciones más restrictivas (tales como una mayor temperatura, una menor fuerza iónica, una mayor concentración de formamida, u otro agente desnaturizante), sin embargo, la tasa de hibridación resultará afectada. En los casos en los que se trata de la hibridación de desoxioligonucleótidos, las condiciones de hibridación restrictivas a título de ejemplo adicionales incluyen lavado en 6X SSC pirofosfato de sodio al 0,05% a 37°C (para oligonucleótidos de 14 bases), 48°C (para oligonucleótidos de 17 bases), 55°C (para oligonucleótidos de 20 bases) y 60°C (para oligonucleótidos de 23 bases).

Pueden incluirse otros agentes en los tampones de hibridación y lavado con el fin de reducir la hibridación no específica y/o de fondo. Los ejemplos son albúmina sérica bovina al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, dodecilsulfato de sodio al 0,1%, NaDodSO₄, (SDS), Ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (u otro ADN no complementario) y sulfato de dextrano, aunque también pueden utilizarse otros agentes adecuados. La concentración y los tipos de estos aditivos pueden cambiarse sin afectar sustancialmente a la restricción de las condiciones de hibridación. Los experimentos de hibridación se llevan a cabo habitualmente a pH 6,8-7,4, sin embargo, en condiciones de fuerza iónica típicas, la tasa de hibridación es prácticamente independiente del pH. Véase Anderson *et al.*, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra). Un experto en la materia puede ajustar las condiciones de hibridación con el fin de dar cabida a estas variables y permitir que ADN de diferente relación de secuencia formen híbridos.

Tal como se indicó anteriormente, los polinucleótidos comprendidos en la presente invención no se limitan a los polinucleótidos PiA específicos de SEC ID nº: 1, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 y 51, sino que también incluyen, por ejemplo, variaciones de especie y alélicas de los mismos. Las variaciones de especie y alélicas pueden determinarse de manera rutinaria comparando la secuencia proporcionada en las SEC ID nº: 1, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 y 51, preferentemente los marcos de lectura abiertos en las mismas, un fragmento representativo de las mismas, o una secuencia de nucleótidos por lo menos idéntica al 90%, preferentemente idéntica al 95%, con los marcos de lectura abiertos dentro de SEC ID nº: 1, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 y 51 con una secuencia de otro aislado de la misma especie u otra especie. Los procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias comprenden de manera no limitativa, el paquete informático GCG, que incluye GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res., 12: 387, 1984; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990). El programa BLASTX está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (*BLAST Manual*, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, citado anteriormente). El bien conocido algoritmo de Smith-Waterman también puede utilizarse para determinar la identidad.

Los polinucleótidos de la invención pueden aislarse a partir de fuentes naturales o pueden sintetizarse mediante técnicas químicas convencionales, por ejemplo, el procedimiento de fosfotriéster descrito en Matteucci *et al.*, J Am Chem Soc., 103: 3185 (1981).

La invención proporciona proteínas quiméricas que comprenden una parte de la proteína PiA de NTHi. En una forma de realización los polipéptidos comprenden las secuencias de aminoácidos de 86-028NP de NTHi expuestas respectivamente en la SEC ID nº: 2. Los polipéptidos de la invención también incluyen los polipéptidos PiA expuestos en las SEC ID nº: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 y 52. En otras formas de realización, los polipéptidos PiA de la invención son los de otras cepas de *H. influenzae* no tipificable y de las cepas de *H. influenzae* a, b, c, e y f.

Los polipéptidos de la invención incluyen específicamente fragmentos peptídicos (es decir, péptidos) o fragmentos del polipéptido PiA que conservan una o más propiedades biológicas o inmunogénicas de un polipéptido de longitud completa de la invención. En una forma de realización, los fragmentos de péptido PiA proporcionados por la invención se designan TfpQ2, TfpQ3, TfpQ4 y OLP3 y comprenden respectivamente los aminoácidos 35 a 68 de SEC ID nº: 2, los aminoácidos 69 a 102 de SEC ID nº: 2, los aminoácidos 103 a 137 de SEC ID nº: 2, y los aminoácidos 21 a 35 de SEC ID nº: 2. Otro fragmento de péptido PiA proporcionado por la invención comprende los aminoácidos 40 a 149 de SEC ID nº: 2.

La invención proporciona asimismo proteínas quiméricas que comprenden una parte de un polipéptido PiA con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas que no afectan a la actividad biológica y/o inmunogénica del polipéptido PiA. Alternativamente, se contempla que los polipéptidos PiA de la invención presenten sustituciones de aminoácidos conservativas que pueden alterar o no la actividad biológica. El término "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a una sustitución de un residuo de aminoácido nativo por un residuo no nativo, incluyendo los aminoácidos que se producen de manera natural y los que no se producen de manera natural, de modo que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o la carga de los residuos de aminoácido en esa posición. Por ejemplo, una sustitución conservativa resulta del reemplazo de un residuo no polar en un polipéptido por otro residuo no polar. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede sustituirse por alanina, según los procedimientos de "mutagénesis por barrido con alanina". Los aminoácidos que se producen de manera natural se caracterizan basándose en sus cadenas laterales tal como sigue: básicos: arginina, lisina, histidina; ácidos: ácido glutámico, ácido aspártico; polares sin carga: glutamina, asparagina, serina, treonina, tirosina; y no polares: fenilalanina, triptófano, cisteína, glicina, alanina, valina,

prolina, metionina, leucina, norleucina, isoleucina. A continuación se exponen en la tabla 1 reglas generales para las sustituciones de aminoácidos.

Tabla 1
Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones ejemplificativas	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asn
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met,	Leu
Lys	Arg, ácido 1,4-diaminobutírico	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Arg
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala,	Leu

La invención proporciona asimismo proteínas quiméricas que comprenden una parte de una variante de los polipéptidos PilA de NTHi de la presente invención (por ejemplo, un polipéptido que presenta por lo menos aproximadamente el 65%, por lo menos aproximadamente el 70%, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, por lo menos aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, normalmente por lo menos aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, más normalmente por lo menos aproximadamente el 98%, o lo más normalmente por lo menos aproximadamente el 99% de identidad de aminoácidos con respecto a un polipéptido de SEC ID n°: 2, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 y 52) que conservan la actividad biológica y/o inmunogénica.

La invención contempla que los polinucleótidos PilA de la invención pueden insertarse en un vector para su amplificación o expresión. Para su expresión, los polinucleótidos se conectan funcionalmente a secuencias de control de la expresión apropiadas tales como las secuencias de señal de poliadenilación y promotora. Además se proporcionan células huésped que comprenden polinucleótidos de la invención. Las células huésped procariotas ejemplificativas incluyen bacterias tales como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Serratia*. Se contemplan específicamente procedimientos de producción de polipéptidos de la invención haciendo crecer las células huésped y aislando polipéptidos de las células huésped o medio de crecimiento. Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden prepararse mediante síntesis química utilizando medios convencionales. Son particularmente convenientes las técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Erikson *et al.*, The Proteins (1976) v. 2, Academic Press, Nueva York, pág. 255). Están disponibles comercialmente sintetizadores en fase sólida automáticos. Además, se realizan fácilmente modificaciones en la secuencia mediante sustitución, adición u omisión de residuos apropiados. Por ejemplo, puede añadirse un residuo de cisteína al extremo carboxi-terminal para proporcionar un grupo sulfhidrilo para la unión

conveniente a una proteína portadora, o pueden incorporarse elementos espaciadores, tales como un residuo de glicina adicional, en la secuencia entre el aminoácido de unión en el extremo C-terminal y el resto del péptido.

El término “aislado” se refiere a una sustancia separada de, y esencialmente libre de, los demás componentes del entorno en el que existe de manera natural. Por ejemplo, un polipéptido se separa de otras proteínas celulares o un ADN se separa de otro ADN que lo flanquea en un genoma en el que se produce de manera natural.

Una proteína PilA recombinante (rPilA) puede generarse para actuar como un producto más fácilmente renovable. Para hacer esto, se utiliza el protocolo publicado de Keizer *et al.* (J. Biol. Chem., 276: 24186-14193, 2001), que estudiaron una pilina que también presentaba cuatro residuos de Cys ya que será crítico que la rPilA se pliegue apropiadamente de manera similar para poseer cualidades funcionales de la subunidad de pilina nativa. En resumen, se diseña mediante ingeniería genética una pilina truncada en la que los primeros 28 residuos se retiran del extremo N-terminal para impedir la agregación, y esta pilina truncada se modificará adicionalmente mediante ingeniería genética para transportarse al periplasma mediante la incorporación de una secuencia líder OmpA en el constructo. Utilizando esta estrategia Keizer *et al.* generaron una proteína pilina de *P. aeruginosa* monomérica soluble recombinante que podía unirse a su receptor (asialo GM1) en ensayos *in vitro* y disminuir la morbilidad en ratones cuando se administraba el péptido 15 minutos antes de la exposición heteróloga. Esta forma truncada, monomérica, soluble de PilA de NTHi será útil en los estudios descritos en la presente memoria.

La invención proporciona asimismo proteínas quiméricas sintéticas. Las proteínas quiméricas pueden sintetizarse, purificarse y secuenciarse utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, las proteínas quiméricas pueden ensamblarse de manera semimanual mediante síntesis en fase sólida con Fmoc-terc-butilo por etapas y purificarse mediante HPLC. La composición y secuencia de aminoácidos de proteínas quiméricas recombinantes y sintéticas pueden confirmarse mediante análisis de aminoácidos y/o análisis de espectrometría de masas.

Anticuerpos

Se describen anticuerpos que se unen a epítopos antigénicos de las proteínas quiméricas de la invención. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo que conservan su capacidad para unirse a su epítipo único (por ejemplo, fragmentos Fv, Fab y F(ab)2), anticuerpos de cadena única y anticuerpos humanos o humanizados. Los anticuerpos pueden generarse mediante técnicas convencionales en la materia utilizando proteína(s) quimérica(s) de la invención o células huésped que expresan proteína(s) quimérica(s) de la invención como antígenos.

Se describen anticuerpos específicos para las proteínas quiméricas de la presente invención y fragmentos de los mismos, que muestran la capacidad tanto de destruir bacterias *H. influenzae* como de proteger a los seres humanos frente a una infección. También se describen anticuerpos específicos para las proteínas quiméricas de la invención que reducen la virulencia, inhiben la adherencia, inhiben la formación de biopelículas, inhiben la motilidad contráctil, inhiben la división celular y/o inhiben la penetración en el epitelio de bacterias *H. influenzae* y/o potencian la fagocitosis de las bacterias *H. influenzae*.

Pueden utilizarse sistemas de ensayos bactericidas mediados por complemento *in vitro* (Musher *et al.*, Infect. Immun. 39: 297-304, 1983; Anderson *et al.*, J. Clin. Invest. 51: 31-38, 1972) para medir la actividad bactericida de anticuerpos antiproteínas quiméricas.

También es posible conferir protección a corto plazo a un huésped mediante inmunoterapia pasiva mediante la administración de anticuerpo previamente formado frente a una proteína quimérica de la invención. Por tanto, pueden utilizarse anticuerpos descritos en la presente memoria en la inmunoterapia pasiva. Se prefiere la inmunoglobulina humana en la medicina de seres humanos porque una inmunoglobulina heteróloga puede provocar una respuesta inmunitaria frente a sus componentes inmunogénicos foráneos. Tal inmunización pasiva podría utilizarse como emergencia para la protección inmediata de individuos no inmunizados sometidos a riesgos especiales.

Pueden utilizarse anticuerpos descritos en la presente memoria en la producción de anticuerpos antiidiotípicos, que a su vez pueden utilizarse como antígeno para estimular una respuesta inmunitaria frente a los epítopos de proteínas quiméricas o epítopos de *H. influenzae*.

Procedimientos para provocar una respuesta inmunitaria y composiciones de los mismos

La invención contempla la utilización de las proteínas quiméricas de la invención para provocar en un individuo una respuesta inmunitaria frente a *H. influenzae* en un individuo. Estas utilizaciones provocan una o más respuestas inmunitarias, incluyendo de manera no limitativa respuestas inmunitarias que inhiben la replicación bacteriana, respuestas inmunitarias que bloquean la adherencia de *H. influenzae* a células, respuestas inmunitarias que impiden la contracción de *H. influenzae*, respuestas inmunitarias que destruyen bacterias *H. influenzae* y respuestas inmunitarias que impiden la formación de biopelículas. Se describen procedimientos que comprenden una etapa que consiste en administrar una dosis inmunogénica de una composición que comprende una o más proteínas quiméricas de la invención. También se describen procedimientos que comprenden administrar una dosis inmunogénica de una composición que comprende una célula que expresa una o más proteínas quiméricas de la invención. Además se describen procedimientos que comprenden administrar una dosis inmunogénica de una composición que comprende

uno o más polinucleótidos que codifican para una o más proteínas quiméricas de la invención. El polinucleótido puede ser un polinucleótido desnudo no asociado a ningún otro ácido nucleico o puede estar en un vector tal como un plásmido o vector viral (por ejemplo, vector de virus adenoasociado o vector de adenovirus). Las composiciones pueden utilizarse en combinación en un único individuo. Las composiciones pueden utilizarse antes o después de la infección por *H. influenzae* de un individuo. Las composiciones de la invención pueden utilizarse para tratar o prevenir cualquier estado patológico que implica *H. influenzae* (cepas tipificables y no tipificables) tal como OM, neumonía, sinusitis, septicemia; endocarditis, epiglotitis, artritis séptica, meningitis, infecciones puerperales y neonatales, sepsis puerperal y neonatal, salpingitis aguda y crónica, pericarditis, celulitis, osteomielitis, endocarditis, colecistitis, infecciones intraabdominales, infección de las vías urinarias, mastoiditis, infección de injerto aórtico, conjuntivitis, fiebre purpúrica brasileña, bacteriemia oculta, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y exacerbación de enfermedades pulmonares subyacentes tales como bronquitis crónica, bronquiectasia y fibrosis quística.

En una forma de realización de la invención, se administra una composición de la invención como dosis de sensibilización seguida por una o más dosis de refuerzo. También se contempla la administración conjunta de proteínas o polipéptidos que potencian beneficiosamente la respuesta inmunitaria tales como citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF), moléculas que inducen citocinas (por ejemplo Leaf) o moléculas coestimulantes.

Una "dosis inmunogénica" de una composición de la invención es una que genera, tras la administración, una respuesta inmunitaria humoral (anticuerpos) y/o celular (células T) detectable en comparación con la respuesta inmunitaria detectable antes de la administración o en comparación con una respuesta inmunitaria convencional antes de la administración. La invención contempla que la respuesta inmunitaria resultante de los procedimientos puede ser protectora y/o terapéutica. En una forma de realización preferida, la respuesta inmunitaria de anticuerpos y/o células T protege al individuo frente a infección por *H. influenzae*, particularmente infección del oído medio y/o la nasofaringe o las vías respiratorias bajas. En esta utilización, la dosis precisa depende del estado de salud y del peso del paciente, el modo de administración, la naturaleza de la formulación, etc., pero generalmente comprendida entre aproximadamente 1,0 µg y aproximadamente 5000 µg por 70 kilogramos de paciente, más comúnmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 500 µg por 70 kg de peso corporal.

La respuesta inmunitaria humoral puede medirse mediante muchos procedimientos bien conocidos, tales como ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID), inmunoensayo con enzimas (EIA) y ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI). En particular, SRID utiliza una capa de un gel, tal como agarosa, que contiene el inmunógeno que está sometiéndose a prueba. Se corta un pocillo en el gel y se coloca en el pocillo el suero que está sometiéndose a prueba. La difusión del anticuerpo hacia el gel conduce a la formación de un anillo de precipitación cuya área es proporcional a la concentración del anticuerpo en el suero que está sometiéndose a prueba. EIA, también conocido como ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), se utiliza para determinar los anticuerpos totales en la muestra. Se adsorbe el inmunógeno en la superficie de una placa de microtitulación. Se expone el suero de prueba a la placa seguido por una inmunoglobulina ligada a enzimas, tal como IgG. Se cuantifica la actividad enzimática adherente a la placa mediante cualquier medio convencional tal como espectrofotometría y es proporcional a la concentración de anticuerpo dirigido contra los inmunógenos presentes en la muestra de prueba. HAI utiliza la capacidad de un inmunógeno tal como proteínas virales para aglutinar glóbulos rojos de pollo (o similares). El ensayo detecta anticuerpos neutralizantes, es decir, los anticuerpos que pueden inhibir la hemaglutinación. Se incuban diluciones del suero de prueba con una concentración patrón de inmunógeno, seguido por la adición de glóbulos rojos. La presencia de anticuerpos neutralizantes inhibirá la aglutinación de los glóbulos rojos por el inmunógeno. Las pruebas para medir la respuesta inmunitaria celular incluyen la determinación de hipersensibilidad de tipo retardado o la medición de la respuesta proliferativa de linfocitos frente al inmunógeno diana.

La invención proporciona correspondientemente composiciones adecuadas para provocar una respuesta inmunitaria frente a proteínas quiméricas de la invención. Tal como se indicó anteriormente, las composiciones comprenden una o más proteínas quiméricas, células que expresan una o más proteínas quiméricas, o uno o más polinucleótidos que codifican para una o más proteínas quiméricas. Las composiciones también pueden comprender otros componentes tales como vehículos y adyuvantes.

En composiciones de la invención, una proteína quimérica puede fusionarse con otra proteína cuando se produce mediante procedimientos recombinantes. En una forma de realización, la otra proteína no puede, por sí misma, producir anticuerpos, pero estabiliza a la primera proteína y forma una proteína de fusión que conserva actividad inmunogénica. En otra forma de realización, la proteína de fusión comprende otra proteína que es inmunogénica, tal como glutatión-S-transferasa (GST) o beta-galactosidasa, coproteínas relativamente grandes que solubilizan la proteína de fusión y facilitan la producción y purificación de la misma. La otra proteína puede actuar como adyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmunitario. La otra proteína puede fusionarse con el extremo o bien amino-terminal o bien carboxi-terminal de las proteínas quiméricas de la invención.

En otras composiciones de la invención, las proteínas quiméricas pueden unirse de otro modo a sustancias portadoras. Puede utilizarse cualquier procedimiento conocido en la materia para crear tales uniones. Pueden formarse uniones mediante agentes hetero-bifuncionales que generan un puente disulfuro en un extremo de grupo funcional y un enlace peptídico en el otro, tal como un agente de formación de amida de disulfuro, por ejemplo, N-succidimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (véase, por ejemplo, Jansen *et al.*, Immun. Rev. 62:185, 1982) y agentes de acoplamiento bifuncionales que forman un tioéter en vez de un puente disulfuro tales como ésteres reactivos de ácido 6-

maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxílico y similares, y agente de acoplamiento que activa grupos carboxilo combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxi-2-nitro-4-sulfónico, para una sal de sodio tal como 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC).

Las proteínas quiméricas pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina y procaína.

Las composiciones de la invención pueden comprender además adyuvantes. Los adyuvantes conocidos incluyen, por ejemplo, emulsiones tales como adyuvantes de Freund y otras emulsiones de aceite, *Bordetella pertussis*, MF59, saponina purificada de *Quillaja saponaria* (QS21), sales de aluminio tales como hidróxido, fosfato y alumbre, fosfato de calcio (y otras sales metálicas), geles tales como sales de hidróxido de aluminio, productos micobacterianos incluyendo dipéptidos de muramilo, materiales sólidos, partículas tales como liposomas y virosomas. Los ejemplos de productos naturales y bacterianos cuya utilización como adyuvantes resulta conocida incluyen monofosforil-lípido A (MPL), RC-529 (monosacárido acilado similar a MPL sintético), OM-174 que es un lípido A derivado de *E. coli*, holotoxinas tales como toxina del cólera (CT) o uno de sus derivados, toxina pertussis (PT) y toxina termolábil (LT) de *E. coli* o uno de sus derivados, y oligonucleótidos de CpG. La actividad del adyuvante puede verse afectada por varios factores, tales como efecto portador, formación de depósitos, recirculación de linfocitos alterada, estimulación de linfocitos T, estimulación directa de linfocitos B y estimulación de macrófagos.

Las composiciones de la invención se formulan normalmente como productos inyectables, o bien como suspensiones o bien como disoluciones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse. El principio inmunogénico activo se mezcla con frecuencia con excipientes, que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, o adyuvantes, que potencian la eficacia de la vacuna. Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, o bien por vía subcutánea o bien por vía intramuscular.

Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, los vehículos y aglutinantes tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5% a 10%, preferentemente de 1 a 2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes utilizados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10% a 95% de principio activo, preferentemente 25 a 70%.

Las composiciones también pueden administrarse mediante vías transdérmicas utilizando inyectores de chorro, microagujas, electroporación, sonoporación, microencapsulación, polímeros o liposomas, vías transmucosas y vías intranasales utilizando pulverizadores, aerosoles y nebulizadores nasales. La microencapsulación utilizando polímeros naturales o sintéticos tales como almidón, alginato y quitosano, D-poli-L-lactato (PLA), microesferas D-poli-DL-lácticas-co-glicólicas, policaprolactonas, poliortoésteres, polianhídridos y polifosfacenos, polifosfatazanos son útiles para la administración tanto transdérmica como transmucosa. Los complejos poliméricos que comprenden péptidos sintéticos de poli-ornitato, poli-lisina y poli-arginina o péptidos anfipáticos son útiles para sistemas de administración transdérmica. Además, debido a su naturaleza anfipática, se contemplan los liposomas para sistemas de administración de vacunas transdérmicos, transmucosas e intranasales. Los lípidos comunes utilizados para la administración de vacunas incluyen sulfato de N-(1,2,3-(dioleil-dihidroxipropil)-N,N,N-trimetilamonio-metilo (DOTAP), cloruro de dioleiloxi-propil-trimetilamonio DOTMA, dimistiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil-amonio (DMRIE), bromuro de dimetildioctadecil-amonio (DDAB) y 9N(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol (DC-Chol). La combinación de lípidos auxiliares y liposomas potenciará la captación de los liposomas a través de la piel. Estos lípidos auxiliares incluyen dioleil-fosfatidiletanolamina (DOPE), dilauroilfosfatidiletanolamina (DLPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE). Además, se han contemplado glicósidos de triterpenoides o saponinas derivadas del quillay chileno (*Quillaja saponaria*) y quitosano (quitano desacetilado) como adyuvantes útiles para la administración de vacunas por vía intranasal y transmucosa.

Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados y quizás almacenados en un estado liofilizado que sólo requiere la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su utilización.

Procedimientos de inhibición de *H. influenzae*

Alternativamente, la invención incluye procedimientos de inhibición de la función de los pili de tipo IV de *H. influenzae* en un individuo. Los procedimientos comprenden administrar al individuo, por ejemplo, uno o más anticuerpos de la invención y/o una o más proteínas quiméricas de la invención; en una cantidad que inhibe la función de los pili. Pueden utilizarse ensayos *in vitro* para demostrar la capacidad para inhibir la función de los pili. Realizaciones de estos procedimientos incluyen, por ejemplo, procedimientos que utilizan inhibidores de adherencia mediada por pili de tipo IV, inhibidores que alteran biopelículas existentes mediadas por pili de tipo IV, e inhibidores de la contractilidad.

Se contempla la inhibición para cualquier estado patológico que implica *H. influenzae*, por ejemplo, OM, neumonía, sinusitis, septicemia, endocarditis, epiglotitis, artritis séptica, meningitis, infecciones puerperales y neonatales, sepsis puerperal y neonatal, salpingitis aguda y crónica, pericarditis, celulitis, osteomielitis, endocarditis, colecistitis, infecciones intraabdominales, infección de las vías urinarias, mastoiditis, infección de injerto aórtico, conjuntivitis, fiebre purpúrica brasileña, bacteriemia oculta, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y exacerbación de enfermedades pulmonares subyacentes tales como bronquitis crónica, bronquiectasia y fibrosis quística.

Se proporcionan composiciones que comprenden inhibidores de la función de los pili de tipo IV de *H. influenzae*. Las composiciones pueden consistir en únicamente uno de los anteriores principios activos, pueden comprender combinaciones de los anteriores principios activos o pueden comprender principios activos adicionales utilizados para tratar infecciones bacterianas. Tal como se trató anteriormente, las composiciones pueden comprender uno o más componentes adicionales tales como vehículos farmacéuticamente eficaces. También tal como se trató anteriormente, la dosificación y la frecuencia de la administración de las composiciones se determinan mediante técnicas convencionales y dependen, por ejemplo, del peso y la edad del individuo, la vía de administración y la gravedad de los síntomas. La administración de las composiciones farmacéuticas puede realizarse por vías convencionales en la materia, por ejemplo, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, rectal, intranasal o vaginal.

Modelo animal

Pueden demostrarse los procedimientos de la invención en un modelo de chinchilla ampliamente aceptado como modelo experimental para OM. En particular, se ha caracterizado bien un modelo de chinchilla de OM inducida por NTHi (Bakaletz *et al.*, J. Infect. Dis., 168: 865-872, 1993; Bakaletz y Holmes, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 4: 223-225, 1997; Suzuki y Bakaletz, Infect. Immun., 62: 1710-1718, 1994; Mason *et al.*, Infect. Immun., 71:3454-3462, 2003), y se ha utilizado para determinar la eficacia de protección de varias proteínas de membrana externa de NTHi, combinaciones de proteínas de membrana externa, componentes de vacunas de péptido sintético quimérico y formulaciones de adyuvantes frente a OM (Bakaletz *et al.*, Vaccine, 15: 955-961, 1997; Bakaletz *et al.*, Infect. Immun., 67: 2746-2762, 1999; Kennedy *et al.*, Infect. Immun., 68: 2756-2765, 2000; Kyd *et al.*, Infect. Immun., 66:2272-2278, 2003; Novotny y Bakaletz, J. Immunol., 171, 1978-1983, 2003).

En el modelo, un adenovirus predispone a las chinchillas a la OM media inducida por *H. influenzae*, lo que permitió establecer sistemas de cultivo de células, tejidos y órganos relevantes para la evaluación biológica de NTHi (Bakaletz *et al.*, J. Infect. Dis., 168: 865-72, 1993; Suzuki *et al.*, Infect. Immunity 62: 1710-8, 1994). Se ha utilizado la infección por adenovirus sola para evaluar la transudación de anticuerpos séricos inducidos en el tímpano (Bakaletz *et al.*, Clin. Diagnostic Lab Immunol., 4(2): 223-5, 1997) y se ha utilizado como copatógeno con NTHi, para determinar la eficacia de protección de varios regímenes de inmunización activa y pasiva que seleccionan como diana diversas proteínas de la membrana externa de NTHi, combinaciones de OMP, componentes de vacuna de péptido sintético quimérico y formulaciones de adyuvantes como vacunógenos frente a la otitis media (Bakaletz *et al.*, Infect Immunity, 67(6): 2746-62, 1999; Kennedy *et al.*, Infect. Immun., 68(5): 2756-65, 2000; Novotny *et al.*, Infect Immunity 68(4): 2119-28, 2000; Poolman *et al.*, Vaccine 19 (Supl. 1): S108-15, 2000).

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La figura 1 proporciona la línea temporal del régimen de inmunización, la inoculación viral, la exposición a bacterias y el periodo de evaluación de la enfermedad OM para los experimentos de la eficacia descritos en el ejemplo 5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, en los que el ejemplo 1 describe la producción recombinante de proteínas quiméricas de la invención, el ejemplo 2 describe ensayos para someter a prueba la inmunogenicidad de las proteínas quiméricas de la invención, el ejemplo 3 describe ensayos para evaluar la inmunización pasiva, el ejemplo 4 describe ensayos para evaluar la inmunización activa y el ejemplo 5 describe la evaluación de una proteína quimérica de la invención.

EJEMPLO 1**Síntesis de proteínas quiméricas**

Se produjeron las proteínas quiméricas de la invención utilizando procedimientos recombinantes

convencionales. Inicialmente, se contrató a una empresa de síntesis génica (Blue Heron Biotechnology Inc.) para preparar el plásmido inicial basándose en las secuencias de aminoácidos de la proteína quimérica descritas en la presente memoria que se optimizaron para la utilización de codones preferidos de *E. coli*. En resumen, se modificó la secuencia de la proteína pilina de NTHi nativa truncando el extremo N-terminal (residuos 1-39 de SEC ID nº: 2) y añadiendo una secuencia de cola de HIS y un sitio de escisión de trombina tal como se expone en la SEC ID nº: 3. La cola de HIS estuvo precedida por una secuencia (MGSS) para ayudar a la expresión. El sitio de escisión de trombina permitió la liberación de la cola de HIS. Entonces se clonaron estos plásmidos en el vector de expresión de *E. coli*, vector pET-15b (Novagen). Entonces se transformó el plásmido en la cepa de *E. coli* "Origami(DE3)" (disponible de Novagen) como huésped para la expresión de proteínas quiméricas con cola de His solubles. Otra cepa de expresión de célula huésped de *E. coli* que puede utilizarse es Origami B(DE3) (Novagen).

Las variantes con cola de His de las proteínas quiméricas se recuperarán mediante cromatografía en columna de níquel, después se utilizan para estudios iniciales para determinar si son reactivas con antisueros dirigidos frente a cualquiera de los siguientes: P5-fimbrina de OMP nativa, LB1 (péptido de 40 aminoácidos de longitud completa), LB1(1) (un péptido sintético que sólo representa el epítipo de células B de 19 aminoácidos de LB1), proteína PilA recombinante o proteína PilA nativa. Una vez retirada la cola de His mediante escisión en el sitio de trombina, se utilizarán las proteínas quiméricas recombinantes como inmunógenos para determinar su inmunogenicidad y capacidad de protección.

Las proteínas quiméricas ejemplificativas de la invención presentan las secuencias expuestas en la tabla 2 a continuación. Las proteínas quiméricas que presentan las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº: 10, 12 y 14 se han expresado mediante *E. coli* tal como se describió anteriormente.

Tabla 2

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica
9	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAHVSELLQASAPYKADVEL CRSDYKFYEDANGTRDHKKGCTGGKNGIAADITAKGYVKS TTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDA SLFPANFCGSVTQ
10	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAHVSELLQASAPYKADVEL CLVRSDYKFYEDANGTRDHKKGHTCTGGKNGIAADITAKGY VKSVTTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCK GTDASLFPANFCGSVTQ
11	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAHVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNCTGGKNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCSRSDYKFYEDANGTRD HKKGCGSVTQ

Tabla 2 (continuación)

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica
12	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAHVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNCTGGKNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCLVRSDYKFYEDANGTR DHKKGRHTCGSVTQ
13	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAHVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNCTGGKNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSV TQ RSDYKFYEDANGTRDHKKG
14	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAHVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNCTGGKNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSV TQLVRSDYKFYEDANGTRDHKKGRHT

15	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CRSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGECTGGKNGIAADITTAKGYVK SVTTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGT DASLFPANFCGSVTQ
16	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CLVRSDYKLYNKNSSSNSTLKNLGERHTCTGGKNGIAADITTA KGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWT TCKGTDASLFPANFCGSVTQ
17	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTTCSRSDYKLYNKSSSNST LKNLGECSVTQ
18	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCLVRSDYKLYNKSSSN STLKNLGERHTCGSVTQ
19	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSV TQRSDYKLYNKSSSNSTLKNLGE
20	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSV TQLVRSDYKLYNKSSSNSTLKNLGERHT
21	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CRSDYKLYNKSSSLKNLGECTGGKNGIAADITTAKGYVKS VTTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDAS LFPANFCGSVTQ
22	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CLVRSDYKLYNKSSSTLKNLGERHTCTGGKNGIAADITTAKG YVKSVTTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWTT CKGTDASLFPANFCGSVTQ
23	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCSRSDYKLYNKSSSTLKN LGECSVTQ
24	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCLVRSDYKLYNKSSSTL KNLGERHTCGSVTQ

Tabla 2 (continuación)

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos de la proteína química
25	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSV TQRSDYKLYNKSSSTLKNLGE
26	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSV TQLVRSDYKLYNKSSSTLKNLGERHT

27	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CRSDYKFYDNKRIDCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAI TVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANF CGSVTQ
28	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CLVRSDYKFYDNKRIDRHTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVT SNGAITVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASL FPANFCGSVTQ
29	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCSRSDYKFYDNKRIDCGS VTQ
30	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCLVRSDYKFYDNKRIDR HTCGSVTQ
31	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSV TQRSDYKFYDNKRID
32	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVEL CVTSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSV TQLVRSDYKFYDNKRIDRHT

Las proteínas quiméricas ejemplificativas adicionales de la invención presentan las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 3 a continuación. Estas proteínas quiméricas se han expresado mediante *E. coli* y se han purificado utilizando una cola de HIS, tal como se describió anteriormente. Las proteínas quiméricas expuestas en la tabla 3 presentan la secuencia de cola de His retirada para su utilización como inmunógeno. La proteína quimérica que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 56 se utilizó en los estudios descritos en el ejemplo 5.

Tabla 3

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica
54	GSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVELCLVRSDYKFYEDANGT RDHKKGRHTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGS VTQ
55	GSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVELCVYSTNETTNCTGGKN GIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGN AATGVTWTTTCLVRSDYKFYEDANGTRDHKKGRHTCGSVTQ

Tabla 3 (continuación)

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica
56	GSHMTKKAAVSELLQASAPYKADVELCVYSTNETTNCTGGKN GIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGN AATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQLVRSDYKFYEDAN GTRDHKKGRHT
57	GSHMLVRSDYKFYEDANGTRDHKKGRHTGPSLKLTKKAAVSE LLQASAPYKADVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYV KSVTTSNGAITVKGDGTLANMEYILQATGNAATGVTWTTTCK GTDASLFPANFCGSVTQ

EJEMPLO 2**Inmunogenicidad de las proteínas quiméricas**

Se inmunizan conejos o chinchillas con las proteínas quiméricas. Los conejos reciben una dosis de inmunización inicial de 500 µg de una proteína quimérica en adyuvante completo de Freund. Los conejos reciben una segunda dosis de 400 µg de la proteína quimérica 21 días después. Los conejos reciben una tercera dosis de proteína quimérica en adyuvante completo de Freund 42 días tras la dosis de inmunización inicial con 400 µg del mismo péptido o bien en IFA o bien en PBS (un conejo por diluyente). Se obtienen sueros 3 semanas tras cada dosis. Las chinchillas reciben una dosis de inmunización inicial de 10 µg de la proteína quimérica en el adyuvante monofosforil-lípido A (MPL). Un mes (~30 días) después, las chinchillas reciben una segunda dosis idéntica. La tercera y última dosis se administra ~30 días tras la segunda dosis. Se obtienen sueros ~10-14 días tras cada dosis. Se evalúan los sueros de todos los animales para determinar el título y la especificidad frente al péptido LB1 (40-mero), LB1(1), proteína PilA y las proteínas quiméricas, mediante ELISA, inmunotransferencia tipo Western y biosensor. También se someten a prueba antisueros frente a bacterias completas mediante análisis por citometría de flujo (FACS).

EJEMPLO 3**Evaluación de la inmunización pasiva**

La protección conferida por la respuesta inmunitaria de un animal dirigida frente a las proteínas quiméricas de la invención se determina en un modelo de chinchilla de otitis media experimental. Se inmunizan pasivamente chinchillas con 5 ml/kg de suero hiperinmunitario de chinchilla o humano dirigido frente a una proteína quimérica de la invención. Las chinchillas control reciben suero de chinchilla normal o suero humano normal. A continuación, las chinchillas reciben un primer copatógeno viral por vía intranasal, después, una semana más tarde, una exposición intranasal a la bacteria NTHi. Se examinan las chinchillas y se clasifican diariamente o cada 2 días durante hasta 35 días tras la exposición bacteriana. Las chinchillas inmunizadas que reciben suero inmunitario de chinchilla o humano muestran una patología de membrana timpánica reducida y una reducción o ausencia de signos de infección del espacio del oído medio según se determina tanto mediante videootoscopia como mediante timpanometría. En este ensayo, se reduce la presencia de fluidos del oído medio en chinchillas que reciben suero de chinchilla o humano anti proteína quimérica en comparación con los controles.

EJEMPLO 4**Evaluación de la inmunización activa**

Se inmunizan activamente cohortes de 5-10 chinchillas cada una con preparación de control de solución salina, una preparación sólo con adyuvante o una de las proteínas quiméricas de la invención que se ha mezclado con un adyuvante apropiado. Se evalúan los inmunógenos para determinar el contenido en endotoxinas antes de su utilización como inmunógeno mediante un ensayo de lisado de amebocitos cromogénico que está comercialmente disponible de Whittaker Bioproducts con la denominación QCL-1000. Entonces se les inyecta por vía subcutánea a las chinchillas 10 µg de inmunógeno en el adyuvante MPL (u otro adyuvante apropiado). Entonces, 30 días más tarde reciben 10 µg del mismo inmunógeno en MPL. Treinta días tras la segunda inmunización, estos animales reciben la dosis de inmunización final. Aproximadamente 10-14 días tras administrar la dosis de inmunización final, se exponen las chinchillas tanto por vía transbular como por vía intranasal a una cepa de NTHi. Se evalúan las chinchillas a lo largo de un periodo de 35 días para determinar: patología de la membrana timpánica mediante examen videootoscópico y timpanometría; semicuantificación de NTHi recuperados mediante punción epitimpánica de la bula inferior y lavado pasivo de la nasofaringe; y examen mediante microscopio óptico de epitelio mucoso del oído medio fijado y membrana timpánica para determinar la histopatología. Por ejemplo, las chinchillas inmunizadas con las proteínas quiméricas de la invención presentarán una patología reducida de la membrana timpánica, estarán libres de efusiones del oído medio o contendrán efusiones que son negativas para el cultivo, presentarán reducción o ausencia de biopelícula presente en el tímpano y existirá un espesamiento mínimo de la mucosa del oído medio, osteoneogénesis mínima y presencia reducida tanto de glóbulos rojos como de células inflamatorias en el espacio subepitelial.

EJEMPLO 5**Evaluación de proteínas quiméricas**

Se evaluó la eficacia de protección de la proteína quimérica que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 56 (denominada "chim-V3" en la presente memoria) utilizando el modelo de OM de superinfección, transferencia pasiva de chinchillas. Este péptido quimérico comprendía el epítipo de células B del péptido LB1 (SEC ID n°: 5) expresado tras el residuo de glutamina C-terminal de PilA recombinante (residuos 40-149 de SEC ID n°: 2). Para generar antisuero policlonal para su utilización en estudios de eficacia de la transferencia pasiva, se administró la proteína chim-V3 a una cohorte de chinchillas adultas con el adyuvante, monofosforil-lípido A (MPL) más dimicolato de trehalosa (Corixa). En la figura 1 se expone una línea temporal que representa el régimen de inmunización. Para generar combinaciones de sueros inmunitarios, se inmunizaron chinchillas propensas a un estado de alerta por vía subcutánea 3 veces con 30 µg de chim-V3 más 10 µg de MPL o 10 µg MPL solo cada 21 días. En el día 56, se recogió una extracción

de sangre terminal de los animales inoculados y se combinó el suero para su transferencia a animales jóvenes no tratados previamente. Para estudiar la eficacia, en primer lugar se expuso una cohorte separada de chinchillas jóvenes a adenovirus en el día -7. Seis días después (día -1), se transfirió de manera pasiva el suero inmunitario antichim-V3 combinado a esos animales comprometidos mediante adenovirus. Al día siguiente (día 0), se expusieron los animales que recibieron suero antichim-V3 mediante transferencia pasiva a la bacteria, *Haemophilus influenzae* no tipificable. Entonces se monitorizaron estos animales para determinar la incidencia y gravedad de la enfermedad a lo largo de un transcurso de tiempo de 26 días (con respecto a la exposición bacteriana) mediante videootoscopia y timpanometría diarias así como obtención de imágenes de Xenogen *in vivo* cada dos días.

Se midió el título de anticuerpo antichim-V3 en el suero inmunitario recogido de los animales inoculados utilizando ELISA. Este análisis demostró que el antisuero recogido contenía anticuerpos específicos para la proteína chim-V3. La presencia de anticuerpos antichim-V3 en el antisuero recogido también se confirmó utilizando análisis mediante inmunotransferencia tipo Western.

Se utilizó análisis de FACS para medir la capacidad de inmunoglobulinas séricas de animales inmunizados para reconocer estructuras nativas expuestas en superficie expresadas por 86-028NP de NTHi. Se incubaron bacterias NTHi con antisuero frente a chim-V3, se lavaron, después se incubaron con FITC-proteína A no tratada previamente o inmunitaria, se lavaron y se analizaron mediante análisis de FACS. La inoculación con la proteína chim-V3 indujo un aumento significativo de anticuerpos que podían reconocer las proteínas de superficie de NTHi o proteína chim-V3. Los datos obtenidos dependían tanto del título y avidez de anticuerpo así como de la expresión relativa tanto de los pili de tipo IV como de la adhesión de homólogo de OMP P5 mediante NTHi cuando se hacía crecer *in vitro*.

Se utilizó el indicador luminiscente pKMLN-1 de 86-028NP de NTHi para detectar la infección por NTHi en los animales en los que se inyectó proteína chim-V3 utilizando la obtención de imágenes en tiempo real de Xenogen *in vivo*. Las curvas de crecimiento de la cepa luminiscente pKMLN-1 de 86-028NP de NTHi y la cepa original 86-028 de NTHi demostraron que el crecimiento de la cepa de NTHi luminiscente era comparable a la cepa original. La obtención de imágenes luminiscentes de NTHi que se encontraban en la nasofaringe de los animales inoculados se lograba fácilmente sin embargo, debido a la naturaleza microaerófila del oído medio enfermo, la luminiscencia de NTHi presentes en el oído medio no pudo monitorizarse a lo largo de todo el transcurso de la enfermedad porque la luminiscencia depende de la disponibilidad de oxígeno. Se monitorizaron los animales cada dos días para determinar la presencia de bacterias luminiscentes, y si se detectaban bacterias, se registraba como acontecimiento luminiscente. Se detectó infección luminiscente por lo menos seis días tras la exposición en los animales inoculados. El número total de acontecimientos luminiscentes en los animales en los que se inoculó chim-V3 fue inferior al número total de acontecimientos luminiscentes en los animales de control (en los que sólo se inoculó MPL).

A lo largo del transcurso del estudio, se utilizaron videootoscopia y timpanometría diarias para determinar el porcentaje de oídos medios de chinchillas con OM. La inoculación de chim-V3 provocó una reducción del 53% en el número de animales en los que los oídos medios presentaban OM en comparación con los animales de control (en los que sólo se inoculó MPL).

Todos estos estudios demuestran que la proteína chim-V3 era inmunogénica y los anticuerpos antichim-V3 eran protectores en el modelo de superinfección-transferencia pasiva de chinchilla de OM.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Children's Hospital Inc.

<120> VACUNA QUIMÉRICA PARA UNA ENFERMEDAD INDUCIDA POR *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

<130> P032165EP

<140> 06800001.7

<141> 05/07/2006

<150> documento US 60/801.835

<151> 19/05/2006

<150> documento US 60/697.642

<151> 08/07/2005

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 4345

<212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

5 <221> CDS

<222> (403)..(849)

<400> 1

```

gcgatcatta aaattgacat attgcgtaat tcgcccattt cgttcgatca aacaatgtgc      60
tgaaacacgc atttgataaa tttctgcaaa ataaggatga atcttaggat ctaattttcc      120
ttgaaaaaaa tcatccacat atccgccgcc aaattgttct ggcggcagac taatataatg      180
aataaccaat aaggaaatat cctgtggatt tgggcgttta tcgaagtgag gtgactgaat      240
ttgccgacaa tccaatatac cttgttcaat atcttttagt ttttgcatat ttttttcctt      300
tttttgcgat caggatcgca gaaaaagtgc ggtcaatttt acaacaaat ttttcctttt      360
cacaatgtcg tcgctaacaa aggccttaata aaaggaaaat ga atg aaa cta aca      414
                               Met Lys Leu Thr
                               1
aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata gag cta atg att      462
Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile
5                               10                               15                               20
gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca att ccc tct tat      510
Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr
25                               30                               35
caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta ctg caa gcg tca      558
Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser
40                               45                               50
gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat agc aca aat gaa      606
Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu
55                               60                               65
aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca gca gat ata acc      654
Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr
70                               75                               80
aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc aac ggt gca ata      702
Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile
85                               90                               95                               100
aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa tat att ttg caa      750
Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln
105                               110                               115
gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca aca act tgc aaa      798
Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys
120                               125                               130
gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc gga agt gtc aca      846
Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
135                               140                               145
caa tgacgagcta tgctttactt catactcagc gtgtaaccgc tcaaaatggc      899
Gln

```

gagatcttta cgatctcgcc agatttatgg gaacgcaatc agcagcaaca atccttgctc 959
 ttgctgtatt ttgctttgcc acttaaagaa gaaaataatc gtctttggct aggggttgat 1019
 tctctctcca atcttttcagc ttgtgaaacc attgcgttta taacaggaaa acctgtcgaa 1079
 ccaattttgt tagaaagcag ccaactcaaa gaactgttac aacaacttac tccgcaccaa 1139
 atgcaagtgg aagagcaagt taaattctat caacatcaag aaaccattt tgaacaagaa 1199
 gatgatgaac ctgttatccg cttacttaat cagatttttg aatctgcctt acaaaaaaat 1259
 gcctctgata ttcatttaga aaccttggct gatcagtttc aagtgcggtt tagaattgat 1319
 ggtgttttac aaccacaacc ctaataagc aaaatattcg ccaatcgat tatttcacgc 1379
 ttaaaattac tggttaaatt agatattagt gaaaatcgac ttccacaaga tggacgattt 1439
 caatttaaaa ccacttttc cgatattctt gattttcgcc tttcaacctt accaaccat 1499
 tggggcgaaa aaatcgtgtt gcgagcgcaa caaaataaac ctgtagaact tagctttgct 1559
 gaactgggta tgaccgaaaa tcagcaacaa gcatttcaac gctcacttag ccagccacaa 1619
 ggattaattt tagtaaccgg cccacagga agtgggaaaa gtatctcgct ttacaccgca 1679
 cttcagtggc taaatcgcc tgataaacat attatgaccg ctgaagatcc cattgaaatt 1739

 gaacttgatg gtattattca aagccaaatt aatccgcaga ttggattaga ttttagccgt 1799
 ctattgcgtg cttttttacg tcaagatccc gacatcatta tgctaggtag aattcgagat 1859
 gaagaaagtg caaggattgc actacgtgcc gctcaaacgg gacatttggg gctttcaact 1919
 ttacatacca atgatgcaat atctgccatt tctcgcttac aacaactcgg tattcaacaa 1979
 catgaaattg aaaacagttt actactcgtc attgcacagc gtctgttacg aaaaatctgt 2039
 ccaaagtgcg gtggaaattt aataaattct tgtgattgcc atcaaggta tcgagggcga 2099

 atcggcgtgt atcaatttct acattggcaa cagaatggct atcaaacgga ttttgagaat 2159
 ttacgagaga gtggtttgga aaaagttagc caaggcataa cagatgagaa agaaattgaa 2219
 cgtgtgttag gtaaaaactc atgactaaaa aactctttta ttatcaagg agtaacgcat 2279
 taaatcagaa acaaaaaggc tcaattattg cggatacgaa acaacaagcg cactttcagt 2339
 taataagccg cgggcttact cacatcaaat tacaacaaaa ctggcaattt ggggcaaaac 2399

```

ccaaaaattc agaaatcagt gaattactca atcaattagc gacattgcta cagtcgtaa . 2459
ttccgttaaa aaacagccta caaatTTTgc aacaaaattg tactcaaatt atgctcaaca 2519
aatggcttga acgactgctt caatccattg aatctggctt agcattctca caagccattg 2579
aacaacaagg aaaatatctc acacaacaag aaattcaact gattcaagtg ggagaaatga 2639
caggaaaact tgcgtagtt tgtaaaaaa tagccacgca ccgtagtcaa tctttggctt 2699
tacaacgcaa attacagaaa attatgttat atccctcaat ggtattggga atttctctat 2759
tattgacact cgcattactg ctttttatcg cgcctcaatt tgctgaaatg tacagtggca 2819
ataatgcgga gttaccaaca ataaccgcaa tattgctctc aatatctaatt ttccttaagc 2879
aaaatattgg catTTTgcta ttttctgtt tgagtTTTT tctattttat tatttctatc 2939
taaaacgcca gacttggtt catcaaaaga aaaatcaact tatttctatc acgcctatTT 2999
ttggcacaat tcaaaagctt tcacgtttag tgaactttag tcaaagttta caaattatgt 3059
tgacggcccg cgtaccgctt aatcaggcac tagacagttt tcttctctcg acacaaactt 3119
ggcaaaccaa gaaaacgctt gtaaacgata tggattaga taaagaagtg cggtaattt 3179
tgcaatgggt tTctcaaggc tatgcgtttt ctaatagcgt aagtagcgat cttttccga 3239
tggaagcaca acaaatgcta caaatggcg aacaaagcgg aaaactcgct ttgatgctag 3299
agcatatcgc agataattac caagaaaaac ttaatcatca aattgactta ctctcacaaa 3359
tgctagaacc attaatgatg gtaatcatcg gcagtctgat tgggattatt atgatgggaa 3419
tgtatttacc tatctttaat atgggatcag ttattcaatg atttacttca caatgtttt 3479
attaggcggc atcttaggga tcgcattgtg gttctaccta tctggtttta ttacgcattt 3539
gcagcaagag atttatgca cttacgttga attatttcca caaacagtt ctccatttca 3599
accgcacttt gcctctattc aacaaaaaaa gtgcggtcat attttgaggt atttttttag 3659

tattgggggt ggatttatat ttttacaat tgccttcaaa gattctatTT ttactgtatg 3719
gatcggaact acacttatta ttctttggac aatcagttat cttgattggc actatcaact 3779
tatttctacg acaccctgtt tatggttact tactctcggt ttatttggcg cagacaataa 3839
cttttcattg ctaacgttat ctgaaagcat. aaaaagtgcg gctagtTTTT ttattgtttt 3899
ctacgcaatc tattggattg caaatgtta ttatagaaaa gaagcctttg gacggggaga 3959
ttattggcta gcaatggcat taggaagttt tattcattta gaaaccttac cgcactTTTT 4019

attattagcc tcagtgttg gaatatgtt ttcgCTTatt cātaaaaaāa aaaaagaatt 4079
tatacctttt gcccctttta tgaacttate ggctatcatt atttatctcg tcaaatatta 4139
cggatattaa aaaggggaaa acataatatt tttcccttgt tcttcataga agtgcggtg 4199
tttttacgaa cgtttcatca cttcaaaaaa ctcttcgttg gttttcgcca tcatcagctt 4259
atcaatcaag aattccattg catccacttc atccattgga ttaagaatct tacgaagaat 4319
ccacatTTTT tgtaattcgt ccgctg 4345

```

<210> 2

5 <211> 149

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 2

Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
35 40 45

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 3

<211> 131

5 <212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 3

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln
20 25 30

Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr
35 40 45

Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp
50 55 60

Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly
65 70 75 80

Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile
85 90 95

Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr
100 105 110

Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser
115 120 125

Val Thr Gln
130

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His
1 5 10 15

Lys Lys Gly

10 <210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 5

Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg
1 5 10 15

Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr
20

<210> 6

<211> 22

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 6

Arg Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser Asn Ser Thr
1 5 10 15

Leu Lys Asn Leu Gly Glu
20

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 7

Arg Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Thr Leu Lys Asp
1 5 10 15

Leu Gly Glu

10 <210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 8

Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Asp Asn Lys Arg Ile Asp
1 5 10

<210> 9

<211> 139

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 9

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Arg Ser Asp Tyr Lys
35 40 45

Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Cys Thr
50 55 60

Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr
65 70 75 80

Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp
85 90 95

Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu
115 120 125

Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135

<210> 10

<211> 143

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 10

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Leu Val Arg Ser Asp
35 40 45

Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly
50 55 60

His Thr Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr
65 70 75 80

Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr
85 90 95

Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala
100 105 110

Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys Gly Thr
115 120 125

Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135 140

10 <210> 11

<211> 136

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

5 <400> 11

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1      5      10      15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
      20      25      30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
      35      40      45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50      55      60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65      70      75      80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
      85      90      95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Arg
      100      105      110

Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys
      115      120      125

Lys Gly Cys Gly Ser Val Thr Gln
130      135

```

<210> 12

10 <211> 141

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

15 <400> 12

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1      5      10      15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
      20      25      30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
      35      40      45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50      55      60

```

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Leu
100 105 110

Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp
115 120 125

His Lys Lys Gly Arg His Thr Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135 140

<210> 13

<211> 148

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 13

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35 40 45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys
100 105 110

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
115 120 125

Gln Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp
130 135 140

His Lys Lys Gly
145

10 <210> 14

<211> 153

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína quimérica

<400> 14

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1          5          10          15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
          20          25          30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
          35          40          45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50          55          60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65          70          75          80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
          85          90          95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys
          100          105          110

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
          115          120          125

Gln Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr
          130          135          140

Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr
145          150

```

10 <210> 15

<211> 142

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Proteína quimérica

<400> 15

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Arg Ser Asp Tyr Lys
35 40 45

Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser Asn Ser Thr Leu Lys Asn Leu Gly
50 55 60

Glu Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala
65 70 75 80

Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val
85 90 95

Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr
100 105 110

Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp
115 120 125

Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135 140

<210> 16

<211> 147

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 16

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Leu Val Arg Ser Asp
35 40 45

Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser Asn Ser Thr Leu Lys Asn
50 55 60

Leu Gly Glu Arg His Thr Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala
65 70 75 80

Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn
85 90 95

Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr
100 105 110

Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr
115 120 125

Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser
130 135 140

Val Thr Gln
145

<210> 17

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 17

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35 40 45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Arg
100 105 110

Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser Asn Ser Thr Leu
115 120 125

Lys Asn Leu Gly Glu Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135

10 <210> 18

<211> 144

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 18

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35 40 45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Leu
100 105 110

Val Arg Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser Asn Ser
115 120 125

Thr Leu Lys Asn Leu Gly Glu Arg His Thr Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135 140

5

<210> 19

<211> 151

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 19

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35 40 45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys
100 105 110

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
115 120 125

Gln Arg Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser Asn Ser
130 135 140

Thr Leu Lys Asn Leu Gly Glu
145 150

<210> 20

<211> 156

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 20

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35 40 45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys
100 105 110

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
115 120 125

Gln Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser
130 135 140

Asn Ser Thr Leu Lys Asn Leu Gly Glu Arg His Thr
145 150 155

10 <210> 21

<211> 139

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína quimérica

<400> 21

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Arg Ser Asp Tyr Lys
35 40 45

Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser Leu Lys Asn Leu Gly Glu Cys Thr
50 55 60

Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr
65 70 75 80

Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp
85 90 95

Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu
115 120 125

Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135

<210> 22

10 <211> 145

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

15 <400> 22

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Leu Val Arg Ser Asp
35 40 45

Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Ser Thr Leu Lys Asn Leu Gly
50 55 60

Glu Arg His Thr Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
65 70 75 80

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
85 90 95

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
100 105 110

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys
115 120 125

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
130 135 140

Gln
145

<210> 23

<211> 136

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 23

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35 40 45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Arg
100 105 110

Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Thr Leu Lys Asn Leu
115 120 125

Gly Glu Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135

10 <210> 24

<211> 141

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína quimérica

<400> 24

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
 1          5          10          15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
 20          25          30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
 35          40          45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
 50          55          60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
 65          70          75          80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
 85          90          95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Leu
100          105          110

Val Arg Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Thr Leu Lys
115          120          125

Asn Leu Gly Glu Arg His Thr Cys Gly Ser Val Thr Gln
130          135          140

```

<210> 25

10 <211> 148

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

15 <400> 25

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg

```

[illegible]

<210> 26

5 $\langle 211 \rangle$ 153

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

10 <400> 26

Met Gly Ser Ser His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35 40 45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys
100 105 110

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
115 120 125

Gln Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Leu Tyr Asn Lys Asn Ser Ser Thr
130 135 140

Leu Lys Asn Leu Gly Glu Arg His Thr
145 150

<210> 27

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 27

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Arg Ser Asp Tyr Lys
35 40 45

Phe Tyr Asp Asn Lys Arg Ile Asp Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile
50 55 60

Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr
65 70 75 80

Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met
85 90 95

Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp
100 105 110

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
115 120 125

Gly Ser Val Thr Gln
130

10 <210> 28

<211> 138

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 28

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
 1          5          10          15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
 20          25          30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Leu Val Arg Ser Asp
 35          40          45

Tyr Lys Phe Tyr Asp Asn Lys Arg Ile Asp Arg His Thr Cys Thr Gly
 50          55          60

Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val
 65          70          75          80

Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly
 85          90          95

Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala
100          105          110

Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe
115          120          125

Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln
130          135

```

5 <210> 29

<211> 130

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína quimérica

<400> 29

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
 1          5          10          15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
 20          25          30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
 35          40          45

```


Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Arg
100 105 110

Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Asp Asn Lys Arg Ile Asp Cys Gly Ser Val
115 120 125

Thr Gln
130

<210> 30

<211> 135

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 30

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20 25 30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35 40 45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65 70 75 80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Leu
100 105 110

Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Asp Asn Lys Arg Ile Asp Arg His
115 120 125

Thr Cys Gly Ser Val Thr Gln
130 135

10 <210> 31

<211> 142

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

5 <400> 31

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1      5      10      15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20      25      30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35      40      45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50      55      60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65      70      75      80

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85      90      95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys
100     105     110

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
115     120     125

Gln Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Asp Asn Lys Arg Ile Asp
130     135     140

```

<210> 32

<211> 147

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 32

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg
1      5      10      15

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
20      25      30

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Thr Ser Thr Asn
35      40      45

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
50      55      60

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
65      70      75      80

```

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
85 90 95

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Cys Lys
100 105 110

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
115 120 125

Gln Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Asp Asn Lys Arg Ile Asp
130 135 140

Arg His Thr
145

<210> 33

<211> 447

5 <212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

10 <400> 33

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata 48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

gag. cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta 144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
35 40 45

ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat 192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca 240
Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

gca gat ata acc aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc 288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

aac ggt gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca 384
Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

gga agt gtc aca caa 447
Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 34

<211> 149

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

5 <400> 34

```

Met  Lys  Leu  Thr  Thr  Gln  Gln  Thr  Leu  Lys  Lys  Gly  Phe  Thr  Leu  Ile
1      5      10      15

Glu  Leu  Met  Ile  Val  Ile  Ala  Ile  Ile  Ala  Ile  Leu  Ala  Thr  Ile  Ala
      20      25      30

Ile  Pro  Ser  Tyr  Gln  Asn  Tyr  Thr  Lys  Lys  Ala  Ala  Val  Ser  Glu  Leu
      35      40      45

Leu  Gln  Ala  Ser  Ala  Pro  Tyr  Lys  Ala  Asp  Val  Glu  Leu  Cys  Val  Tyr
      50      55      60

Ser  Thr  Asn  Glu  Thr  Thr  Asn  Cys  Thr  Gly  Gly  Lys  Asn  Gly  Ile  Ala
65      70      75      80

Ala  Asp  Ile  Thr  Thr  Ala  Lys  Gly  Tyr  Val  Lys  Ser  Val  Thr  Thr  Ser
      85      90      95

Asn  Gly  Ala  Ile  Thr  Val  Lys  Gly  Asp  Gly  Thr  Leu  Ala  Asn  Met  Glu
      100     105     110

Tyr  Ile  Leu  Gln  Ala  Thr  Gly  Asn  Ala  Ala  Thr  Gly  Val  Thr  Trp  Thr
      115     120     125

Thr  Thr  Cys  Lys  Gly  Thr  Asp  Ala  Ser  Leu  Phe  Pro  Ala  Asn  Phe  Cys
      130     135     140

Gly  Ser  Val  Thr  Gln
145

```

<210> 35

<211> 447

10 <212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

15 <400> 35

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata 48
 Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
 1 5 10 15
 gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
 Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
 20 25 30
 att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta 144
 Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
 35 40 45
 ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat 192
 Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
 50 55 60
 agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca 240
 Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 gca gat ata acc aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc 288
 Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
 85 90 95
 aac ggt gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
 Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
 100 105 110
 tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca 384
 Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
 115 120 125
 aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432

 Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
 130 135 140
 gga agt gtc aca caa 447
 Gly Ser Val Thr Gln
 145

<210> 36

<211> 149

5 <212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 36

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

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 37

<211> 447

<212> ADN

5 <213> *Haemophilus influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 37

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata 48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta 144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
35 40 45

ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat 192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca 240
Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

gca gat ata acc aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc 288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

aac ggt gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca 384
Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

gga agt gtc aca caa 447
Gly Ser Val Thr Gln
145

10 <210> 38

<211> 149

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 38

Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
35 40 45

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

5 <210> 39

<211> 447

<212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 39

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata 48
 Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
 1 5 10 15
 gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
 Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
 20 25 30
 att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta 144
 Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
 35 40 45
 ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat 192
 Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
 50 55 60
 agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca 240
 Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 gca gat ata acc aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc 288
 Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
 85 90 95
 aac ggt gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
 Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
 100 105 110
 tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca 384
 Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
 115 120 125
 aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432
 Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
 130 135 140
 gga agt gtc aca caa 447
 Gly Ser Val Thr Gln
 145

<210> 40

5 <211> 149

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 40

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

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 41

<211> 447

<212> ADN

5 <213> *Haemophilus influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 41

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggt ttt aca tta atc 48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

att cct tct tat caa aat tat acc aaa aaa gct tcg gta tcc gaa tta 144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ser Val Ser Glu Leu
35 40 45

ctg caa gca tct gca cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat 192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca 240
Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa 288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

tcg ggt ggc att aca gta aaa ggg aat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

tat att ttg caa gct aaa ggt aat gct aca gca ggt gta act tgg aca 384
Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

aca acc tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

aga agt gtc aca aaa 447
Arg Ser Val Thr Lys
145

<210> 42

<211> 149

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

5 <400> 42

```

Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
 1          5          10          15

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
 20          25          30

Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ser Val Ser Glu Leu
 35          40          45

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
 50          55          60

Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
 65          70          75          80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
 85          90          95

Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100          105          110

Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115          120          125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130          135          140

Arg Ser Val Thr Lys
145

```

<210> 43

<211> 447

10 <212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

15 <400> 43

```

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata      48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1      5      10      15

gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc acc atc gca      96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
      20      25      30

att cct tct tat aaa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta      144
Ile Pro Ser Tyr Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
      35      40      45

ctg caa gct tct gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat      192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
      50      55      60

agc aca aat gaa ata aca aat tgt atg ggt gga aaa aat ggt att gca      240
Ser Thr Asn Glu Ile Thr Asn Cys Met Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
      65      70      75      80

gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa      288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
      85      90      95

tcg ggt ggc att acc gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa      336
Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
      100      105      110

tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca gca ggt gta act tgg aca      384
Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Ala Gly Val Thr Trp Thr
      115      120      125

aca acc tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc      432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
      130      135      140

gga agt atc aca caa
Gly Ser Ile Thr Gln
145

```

<210> 44

<211> 149

5 <212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 44

```

Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1      5      10      15

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
      20      25      30

Ile Pro Ser Tyr Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
      35      40      45

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
      50      55      60

Ser Thr Asn Glu Ile Thr Asn Cys Met Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
      65      70      75      80

```

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Ile Thr Gln

145

<210> 45

<211> 447

5 <212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

10 <400> 45

atg aaa tta aca aca ctg caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta atc 48
Met Lys Leu Thr Thr Leu Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

att cct tct tat caa aat tat acc aaa aaa gct gcg gta tcc gaa tta 144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
35 40 45

ctg caa gct tct gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgc gtt tat 192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

agc aca ggc aaa cct tct act tgc tca gga gga agc aat gga att gca 240
Ser Thr Gly Lys Pro Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

gct gat att acg aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa 288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

tca ggt ggt att aca gta aaa ggg aat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca 384
Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

gga agt gtc aca caa 447
Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 46

<211> 149

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

5 <400> 46

```

Met  Lys  Leu  Thr  Thr  Leu  Gln  Thr  Leu  Lys  Lys  Gly  Phe  Thr  Leu  Ile
1      5      10      15

Glu  Leu  Met  Ile  Val  Ile  Ala  Ile  Ile  Ala  Ile  Leu  Ala  Thr  Ile  Ala
20      25      30

Ile  Pro  Ser  Tyr  Gln  Asn  Tyr  Thr  Lys  Lys  Ala  Ala  Val  Ser  Glu  Leu
35      40      45

Leu  Gln  Ala  Ser  Ala  Pro  Tyr  Lys  Ala  Asp  Val  Glu  Leu  Cys  Val  Tyr
50      55      60

Ser  Thr  Gly  Lys  Pro  Ser  Thr  Cys  Ser  Gly  Gly  Ser  Asn  Gly  Ile  Ala
65      70      75      80

Ala  Asp  Ile  Thr  Thr  Ala  Lys  Gly  Tyr  Val  Ala  Ser  Val  Lys  Thr  Gln
85      90      95

Ser  Gly  Gly  Ile  Thr  Val  Lys  Gly  Asn  Gly  Thr  Leu  Ala  Asn  Met  Glu
100     105     110

Tyr  Ile  Leu  Gln  Ala  Thr  Gly  Asn  Ala  Ala  Thr  Gly  Val  Thr  Trp  Thr
115     120     125

Thr  Thr  Cys  Lys  Gly  Thr  Asp  Ala  Ser  Leu  Phe  Pro  Ala  Asn  Phe  Cys
130     135     140

Gly  Ser  Val  Thr  Gln
145

```

<210> 47

10 <211> 447

<212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

<221> CDS

15 <222> (1)..(447)

<400> 47

atg aaa tta aca aca ctg caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta atc 48
 Met Lys Leu Thr Thr Leu Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
 1 5 10 15
 gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
 Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
 20 25 30
 att cct tct tat caa aat tat acc aaa aaa gct gcg gta tcc gaa tta 144
 Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
 35 40 45
 ctg caa gct tct gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgc gtt tat 192
 Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
 50 55 60
 agc aca ggc aaa ctt tct act tgc tca gga gga agc aat gga att gca 240
 Ser Thr Gly Lys Leu Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa 288
 Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
 85 90 95
 tca ggt ggt att aca gta aaa ggg aat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
 Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
 100 105 110
 tat att ttg caa gct aaa ggt aat gct aca gca ggt gta act tgg aca 384
 Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
 115 120 125
 aca acc tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432
 Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
 130 135 140
 gga agt gtc aca aaa 447
 Gly Ser Val Thr Lys
 145

<210> 48

5 <211> 149

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 48

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

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Lys
145

<210> 49

<211> 447

5 <212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

10 <400> 49

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggt ttt aca tta atc 48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

att cct tct tat caa aat tat acc aaa aaa gct tcg gta tcc gaa tta 144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ser Val Ser Glu Leu
35 40 45

ctg caa gct tcc gca cct tat aag tca gat gtg gaa tta tgc gtt tat 192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ser Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

agc aca ggc aaa cct tct act tgc tca gga gga agc aat gga att gca 240
Ser Thr Gly Lys Pro Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa 288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

tca ggt ggt att aca gta aaa ggg aat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

tat att ttg caa gct aaa ggt aat gct aca gca ggt gta act tgg aca 384
Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

aca acc tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

aga agt gtc aca aaa 447
Arg Ser Val Thr Lys
145

<210> 50

<211> 149

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 50

Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ser Val Ser Glu Leu
35 40 45

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ser Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Gly Lys Pro Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Arg Ser Val Thr Lys
145

5 <210> 51

<211> 447

<212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae*

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 51

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata 48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1 5 10 15

gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca 96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gcg gcg gta tct gaa tta 144

Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
 35 40 45

ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat 192
 Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
 50 55 60

agt aca ggt aaa cct tcc agt tgc tcg gga gga agc aat gga att gcg 240
 Ser Thr Gly Lys Pro Ser Ser Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala
 65 70 75 80

gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc 288
 Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
 85 90 95

aac ggt gca ata aca gta aaa ggc gat ggc aca ttg gca aat atg gaa 336
 Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
 100 105 110

tat att ttg caa gcc agt ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca 384
 Tyr Ile Leu Gln Ala Ser Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
 115 120 125

aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc 432
 Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
 130 135 140

gga agt gtc aca caa 447
 Gly Ser Val Thr Gln
 145

<210> 52

<211> 149

5 <212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 52

Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
 1 5 10 15

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
 20 25 30

Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
 35 40 45

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
 50 55 60

Ser Thr Gly Lys Pro Ser Ser Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala
 65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
 85 90 95

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu

100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Ser Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 53

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 53

Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His
1 5 10 15

Lys Lys Gly Pro Ser Leu Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile
20 25 30

Val His Arg Leu Glu Gly Val Glu
35 40

10 <210> 54

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Proteína quimérica

<400> 54

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
1 5 10 15

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Leu Val Arg Ser Asp
20 25 30

Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly
35 40 45

Arg His Thr Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr
50 55 60

Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile

65 70 75 80

Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln
 85 90 95

Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys
 100 105 110

Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr
 115 120 125

Gln

<210> 55

<211> 126

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 55

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn
 20 25 30

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
 35 40 45

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
 50 55 60

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys
 85 90 95

Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg
 100 105 110

Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr Cys Gly Ser Val Thr Gln
 115 120 125

10

<210> 56

<211> 138

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Proteína quimérica

<400> 56

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn
 20 25 30

Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile
 35 40 45

Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
 50 55 60

Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys
 85 90 95

Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val
 100 105 110

Thr Gln Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly
 115 120 125

Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr
 130 135

<210> 57

<211> 144

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica

<400> 57

Gly Ser His Met Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr Gly Pro Ser Leu
 20 25 30

Lys Leu Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala
 35 40 45

Pro	Tyr	Lys	Ala	Asp	Val	Glu	Leu	Cys	Val	Tyr	Ser	Thr	Asn	Glu	Thr
50						55					60				
Thr	Asn	Cys	Thr	Gly	Gly	Lys	Asn	Gly	Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Thr	Thr
65					70				75						80
Ala	Lys	Gly	Tyr	Val	Lys	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Gly	Ala	Ile	Thr
				85					90					95	
Val	Lys	Gly	Asp	Gly	Thr	Leu	Ala	Asn	Met	Glu	Tyr	Ile	Leu	Gln	Ala
			100					105					110		
Thr	Gly	Asn	Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Thr	Trp	Thr	Thr	Thr	Cys	Lys	Gly
		115					120						125		
Thr	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Pro	Ala	Asn	Phe	Cys	Gly	Ser	Val	Thr	Gln
130						135					140				

REIVINDICACIONES

1. Proteína quimérica que comprende una parte de la proteína PilA de *H. influenzae* no tipificable (NTHi) (SEC ID nº: 2) y una parte del péptido LB1 (SEC ID nº: 53), pudiendo provocar la proteína quimérica una respuesta inmunitaria a las bacterias NTHi.
- 5 2. Proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que la parte del péptido LB1 comprende el epítipo de células B del péptido LB1.
3. Proteína quimérica según la reivindicación 2, en la que la parte del péptido LB1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4, SEC ID nº: 5, SEC ID nº: 6, SEC ID nº: 7 o SEC ID nº: 8.
- 10 4. Proteína quimérica según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 9, SEC ID nº: 10, SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 13, SEC ID nº: 14, SEC ID nº: 15, SEC ID nº: 16, SEC ID nº: 17, SEC ID nº: 18, SEC ID nº: 19, SEC ID nº: 20, SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 23, SEC ID nº: 24, SEC ID nº: 25, SEC ID nº: 26, SEC ID nº: 27, SEC ID nº: 28, SEC ID nº: 29, SEC ID nº: 30, SEC ID nº: 31, SEC ID nº: 32, SEC ID nº: 54, SEC ID nº: 55, SEC ID nº: 56 o SEC ID nº: 57.
- 15 5. Proteína quimérica según la reivindicación 4, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 57.
6. Proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que la parte de la proteína PilA de NTHi comprende los residuos 40-149 de SEC ID nº: 2.
7. Proteína quimérica según la reivindicación 6, en la que el epítipo de células B de LB1 está insertado antes del residuo 40 de SEC ID nº: 2.
- 20 8. Proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 6 ó 7, en la que el epítipo de células B de LB1 comprende SEC ID nº: 5.
9. Polinucleótido que codifica para la proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 9.
- 25 11. Composición que comprende una proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Composición según la reivindicación 11, en la que la composición está formulada para una vía de administración seleccionada de entre el grupo constituido por administración parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, rectal, intranasal, transdérmica, subcutánea, intramuscular o vaginal.
- 30 13. Utilización de una o más proteínas quiméricas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la preparación de un medicamento en un paciente en riesgo de padecer una infección por bacterias NTHi para provocar una respuesta inmunitaria a las bacterias NTHi.
14. Utilización según la reivindicación 13, en la que la infección por NTHi es en el oído medio, la nasofaringe o las vías respiratorias inferiores.
- 35 15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en la que el medicamento está formulado para una vía de administración seleccionada entre el grupo constituido por administración parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, rectal, intranasal, transdérmica, subcutánea, intramuscular o vaginal.
- 40 16. Utilización según la reivindicación 13 ó 14, en la que la infección por bacterias NTHi implica un estado patológico seleccionado de entre el grupo constituido por otitis media, neumonía, sinusitis, septicemia, endocarditis, epiglotitis, artritis séptica, meningitis, sepsis, salpingitis, pericarditis, celulitis, osteomielitis, endocarditis, colecistitis, infecciones intraabdominales, infección de las vías urinarias, mastoiditis, infección de injerto aórtico, conjuntivitis, fiebre purpúrica brasileña, bacteriemia oculta, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, bronquiectasia y fibrosis quística.
- 45 17. Proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización en la provocación de una respuesta inmunitaria a las bacterias NTHi en un paciente en riesgo de padecer una infección por bacterias NTHi.
18. Proteína quimérica según la reivindicación 17, en la que la infección por NTHi se encuentra en el oído medio, la nasofaringe o las vías respiratorias inferiores.
- 50 19. Proteína quimérica según la reivindicación 17, en la que la infección por bacterias NTHi implica un estado patológico seleccionado de entre el grupo constituido por otitis media, neumonía, sinusitis, septicemia, endocarditis, epiglotitis, artritis séptica, meningitis, sepsis, salpingitis, pericarditis, celulitis, osteomielitis, endocarditis, colecistitis, infecciones intraabdominales, infección de las vías urinarias, mastoiditis, infección de injerto aórtico, conjuntivitis, fiebre

purpúrica brasileña, bacteriemia oculta, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ,bronquitis crónica, bronquiectasia y fibrosis quística.

20. Proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización en el tratamiento o la prevención de la infección por bacterias NTHi en un paciente que lo necesite.

5 21. Proteína quimérica según la reivindicación 20, en la que la infección por NTHi se encuentra en el oído medio, la nasofaringe o las vías respiratorias inferiores.

Figura 1

