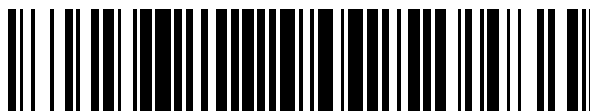


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 814**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/04** (2006.01)

**A61K 38/14** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61K 39/102** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06817659 .3**

96 Fecha de presentación: **23.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1996715**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Antígenos bacterianos y usos de los mismos**

30 Prioridad:  
**23.11.2005 US 738985 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2012**

73 Titular/es:  
**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA  
(100.0%)  
INTELLECTUAL PROPERTY SERVICES OFFICE  
EG06B BLDG. M-58, MONTREAL ROAD  
OTTAWA, ONTARIO K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:  
**COX, ANDREW;  
NEELAMEGAN, DHAMODHARAN;  
SCHOENHOFEN, IAN;  
ST. MICHAEL, FRANK y  
RICHARDS, JAMES C.**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

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).

ES 2 389 814 T3

## DESCRIPCIÓN

Antígenos bacterianos y usos de los mismos

## Información de solicitudes anteriores

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. 60/738.985, presentada el 23 de noviembre, 2005.

## Antecedentes de la invención

Las bacterias gram-negativas pueden causar enfermedades de preocupación en salud pública y económica significativa en seres humanos y en otros animales. Se están persiguiendo estrategias de vacunas para combatir estas infecciones. Estas estrategias se basan en la identificación de componentes de superficie celular inmunogénicos, conservados; sin embargo, la detección de moléculas conservadas que debería conferir protección contra la gran mayoría de las cepas de una única especie ha demostrado ser problemática.

La superficie exterior de la membrana externa de todas las bacterias gram-negativas contiene una molécula de carbohidratos anfífila llamada lipopolisacárido (LPS) que en virtud de su localización de superficie puede considerarse como un antígeno candidato de vacuna. Como su nombre sugiere esta molécula contiene una región lipídica que une a la molécula en la membrana exterior, en virtud tanto de ácidos grasos unidos a ésteres (O-ligados) como de ácidos grasos unidos a amida (N-ligados). La región de lípidos A y específicamente los ácidos grasos son responsables de la actividad endotóxica de la bacteria gram-negativa y consisten en la mayoría de las especies de un disacárido de azúcares de glucosamina que están fosforiladas y los ácidos grasos unidos a ésteres y unidos a amidas como se muestran en las figuras 1 y 2.

El oligosacárido de núcleo se puede dividir arbitrariamente en un núcleo externo e interno y está conectado a la región de lípidos A por medio de uno o más azúcar(es) de cetosa, ácido 2-ceto-3-deoxi-octulosónico (Kdo). Una unidad de repetición polimérica (O-antígeno) puede estar presente o ausente más allá del oligosacárido de núcleo de la molécula de LPS. El O-antígeno es un resto variable entre cepas de la misma especie y a menudo es el antígeno responsable de los esquemas de serotipado adoptados para clasificar una especie. Debido a su naturaleza variable dentro de la mayoría de las especies el O-antígeno no es un buen candidato para vacunas ya que los anticuerpos dirigidos a un O-antígeno serán específicos de serotipo y no ofrecen protección a los otros serotipos de la misma cepa. De forma similar la región de núcleo externo puede ser algo variable dentro de una especie y no es por lo tanto un buen candidato para vacunas. Sin embargo, lo que se denomina de forma arbitraria el oligosacárido de núcleo interno se ha encontrado que está conservado dentro de varias especies y es el antígeno de vacuna de elección en esta solicitud. Las regiones conservadas de moléculas de LPS se han identificado en el núcleo oligosacárido de varias especies y los ejemplos de estructuras oligosacáridicas de núcleo se detallan en la figura 3 más adelante para LPS de las especies *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Mannheimia haemolytica*. Para los propósitos de este debate, pero no restringido a justamente estas estructuras, la región de núcleo interior para *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Mannheimia haemolytica* vinculada a la región de lípido A se ilustra en las figuras 3b-d. Sin embargo la tecnología descrita aquí sería igualmente aplicable a los otros antígenos de carbohidratos de LPS, oligosacárido de núcleo externo y O-antígeno.

La endotoxicidad de la región de lípido A se debe a los residuos de ácidos grasos. La eliminación de los ácidos grasos unidos a ésteres deja una especie de LPS O-deacilada que ya no es endotóxica. La eliminación de todos los ácidos grasos es decir tanto de los ácidos grasos unidos a amida como de los ácidos grasos unidos a ésteres puede llevarse a cabo químicamente, pero implica condiciones severas que pueden hacer efecto en otras regiones de la molécula de LPS. Incluso las condiciones químicas suaves empleadas para efectuar la O-deacilación pueden hacer efecto sobre residuos unidos a éster en cualquier parte en el LPS.

Las vacunas basadas en LPS requieren generalmente la retirada de ácidos grasos de la región de lípido A de la molécula para reducir la endotoxicidad. Preferentemente, esta etapa de detoxificación no modifica los epítomos de carbohidratos en la molécula de LPS, sin embargo las técnicas comúnmente disponibles no lo permiten.

Los procedimientos actuales empleados son para O-deacilar químicamente LPS produciendo una molécula de LPS O-deacilada (LPS-OH) que puede usarse bien directamente o bien tras modificación adicional para conjugar a un vehículo proteico adecuado para producir un candidato de vacuna glucoconjugado. La eliminación de los ácidos grasos N-ligados que quedan de LPS-OH mejoraría grandemente las estrategias de conjugación, ya que esto crearía una molécula completamente soluble en agua susceptible de todas las manipulaciones subsiguientes. Sin embargo, los procedimientos químicos actualmente empleados para de-N-acilar moléculas de LPS modifican también algunos residuos en el núcleo interno, alterando así la estructura de epítomos potencialmente inmunogénicos en la molécula de LPS. Por ejemplo el residuo de fosfoetanolamina (PEtn) del oligosacárido de núcleo interno de LPS de *Neisseria meningitidis* (fig. 3ab), un resto inmunogénico conocido, es sensible a las condiciones químicas requeridas para retirar los ácidos grasos N-ligados, modificando así un residuo conservado en el LPS de núcleo interno y creando así una molécula que ya no es representativa de la estructura de LPS nativa.

**Sumario de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de preparar una vacuna que comprende:

- 5            separar lipopolisacáridos de una bacteria de interés;
- desesterificar el lipopolisacárido;
- retirar al menos un ácido graso N-ligado del lipopolisacárido con una actividad amidasa aislada; y
- conjugar el lipopolisacárido modificado con una molécula transportadora adecuada.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de recuperar un lipopolisacárido modificado de una bacteria de interés que comprende:

- 10          separar lipopolisacáridos de la bacteria de interés;
- desesterificar el lipopolisacárido;
- retirar al menos un ácido graso N-ligado del lipopolisacárido con una actividad amidasa aislada; y
- recuperar el LPS modificado.

- 15          De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona una molécula de lipopolisacárido (LPS) mono-N-acilada-de-O-acilada o una molécula de LPS de-N-acilada-de-O-acilada a partir de una bacteria de interés conjugado a una proteína transportadora.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona el uso del conjugado según se describe anteriormente para la inmunización de individuos que tienen o son sospechosos de tener o están en riesgo de desarrollar una infección por la bacteria de interés.

- 20          De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona el uso del conjugado como se describe anteriormente en la elaboración de un medicamento para la inmunización de individuos que tienen o son sospechosos de tener o están en riesgo de desarrollar una infección por la bacteria de interés

**Breve descripción de los dibujos**

- 25          La figura 1 es una representación esquemática de la región de lípido A de molécula LPS de *Escherichia coli* donde R es la región de oligosacárido-O-antígeno de núcleo de la molécula de LPS y los números en la parte de abajo de la figura se refieren a la longitud de cadenas de las moléculas de ácidos grasos. La fosforilación del lípido A también puede variar, por ejemplo, P, P-P o P-PEtn.

- 30          La figura 2 es una representación esquemática de de la región de lípido A de la molécula de LPS de *Neisseria meningitidis*, donde R es la región de oligosacáridos de núcleo de la molécula de LPS y los números en la parte de abajo de la figura se refieren a la longitud de cadena de las moléculas de ácidos grasos. La fosforilación del lípido A también puede variar, por ejemplo P, P-P o P-PEtn.

La figura 3(a) es una representación esquemática del oligosacárido de núcleo de la molécula de LPS de *Neisseria meningitidis*.

- 35          La figura 3(b) es una representación esquemática del oligosacárido de núcleo de la molécula de LPS de la cepa mutante *galE* de *Neisseria meningitidis*.

La figura 3(c) es una representación esquemática del oligosacárido de núcleo de la molécula de LPS de la cepa mutante *IpsA lic1* de *Haemophilus influenzae*.

La figura 3(d) es una representación esquemática del oligosacárido de núcleo de la molécula de LPS de la cepa mutante *losB* de *Mannheimia haemolytica*.

- 40          La figura 4 es una representación esquemática de localización de actividades amidasa de ácidos grasos en lípido A de *Neisseria meningitidis*.

La figura 5a es la secuencia de aminoácidos *Dd1*.

La figura 5b es la secuencia de aminoácidos de *Dd2*.

La figura 6 es un alineamiento de secuencia consenso de amidasa de ácidos grasos. Comparación de secuencia de

FAAH entre ser humano (FAAHI y FAAHII), Rata, Dictyostelium (DD1 y DD2) y Arabidopsis. Las amidasas de Dictyostelium (DD1 y DD2) comparten la firma de amidasa (subrayada) y el motivo conservado, GGSS(G/A/S)G (recuadrado) en la firma de amidasa predicha con otros miembros.

5 La figura 7 es *Dd1*: un exón con codones de inicio subrayados, codones de parada en negrita, indicadores de inicio y de fin de exones en negrita cursiva y cebadores con doble subrayado.

La figura 8 *Dd2*: 4 exones y 3 intrones, con codones de inicio subrayados, codones de parada en negrita, indicadores de inicio y de fin de exones en negrita cursiva y cebadores con doble subrayado.

La figura 9 es una representación estructural de molécula de LPS mono-N-acilada-de-O-acilada de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*.

10 La figura 10 es una representación estructural de molécula de LPS de-N-acilada-de-O-acilada de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*.

La figura 11 es una representación estructural de molécula de LPS mono-N-acilada-de-O-acilada de cepa 1003 *lic1lpsA* de *Haemophilus influenzae*.

15 La figura 12 es una representación estructural de molécula de LPS de-N-acilada-de-O-acilada de cepa 1003 *lic1lpsA* de *Haemophilus influenzae*.

La figura 13 es una representación estructural de molécula de LPS mono-N-acilada-de-O-acilada de cepa 1003 *lic1lpt6* de *Haemophilus influenzae*.

La figura 14 es una representación estructural de molécula de LPS de-N-acilada-de-O-acilada de cepa 1003 *lic1lpt6* de *Haemophilus influenzae*.

20 La figura 15 es una representación estructural de molécula de LPS mono-N-acilada-de-O-acilada de cepa *losB* de *Mannheimia haemolytica*.

La figura 16 es una representación estructural de molécula de LPS de-N-acilada-de-O-acilada de cepa *losB* de *Mannheimia haemolytica*.

La figura 17 es una representación esquemática del gen *Dd1* clonado.

25 La figura 18 es un análisis de SDS-PAGE de proteína de fusión *Dd1*-MBP-6X His recombinante expresada en *E. coli*.

La figura 19 es una representación esquemática del gen *Dd2* clonado.

La figura 20 es un análisis de SDS-PAGE de proteína de fusión de *Dd2*-MBP-6X His recombinante expresada en *E. coli*.

30 La figura 21 es una representación esquemática del ensayo colorimétrico de actividad amidasa de *Dd1* y *Dd2* recombinante.

La figura 22 es un análisis de prueba de bandas de western de expresión in vivo de *Dd2* en células de *Dictyostelium*. El antisuero policlonal reconoce una proteína in vivo a 70 kDa y también reconoce una proteína de 175 kDa que se puede modificar *Dd2*, *Dd1* o una proteína no específica.

35 La figura 23 es una SDS-PAGE tras inmunoprecipitación de proteína *Dd2* in vivo usando antisueros policlonales NRC-*Dd2*, teñidos con azul de Coomassie.

La figura 24 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*, después del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* tras el crecimiento de *Dictyostelium* con *Klebsiella aerogenes*.

40 La figura 25 es el espectro de EC-EM-EM de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*, que revela tamaño de lípido A consistente con la presencia de dos ácidos grasos N-ligados.

La figura 26 es el espectro de EC-EM-EM de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* después de tratamiento con amidasa de *Dictyostelium discoideum*, revelando tamaño de lípido A consistente con la presencia de ácidos grasos N-ligados.

45 La figura 27 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa 1003 *lic1lpsA* de *Haemophilus influenzae*, después de tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* tras el crecimiento de *Dictyostelium* con *Klebsiella aerogenes*.

- La figura 28 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa *losB* de *Mannheimia haemolytica*, después de tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas tras el crecimiento de *Dictyostelium* con *Klebsiella aerogenes*.
- 5 La figura 29 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*, después del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas tras la privación de nutrientes de *Dictyostelium*.
- La figura 30 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa 1003 *lic1lpsA* de *Haemophilus influenzae*, después del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas tras privación de nutrientes de *Dictyostelium*.
- 10 La figura 31 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa *losB* de *Mannheimia haemolytica*, después del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas tras privación de nutrientes de *Dictyostelium*.
- La figura 32 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*, después del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas tras cultivo de *Dictyostelium* axénicamente.
- La figura 33 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa 1003 *lic1lpsA* de *Haemophilus influenzae*, después de tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas tras cultivo de *Dictyostelium* axénicamente.
- 15 La figura 34 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa *losB* de *Mannheimia haemolytica*, después del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas tras el cultivo de *Dictyostelium* axénicamente.
- La figura 35 es una representación esquemática de actividad de amidasa I de ácidos grasos aislados en LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*.
- 20 La figura 36 es una representación esquemática de actividad de amidasa II de ácidos grasos aislados en LPS O-deacilado, mono-N-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*.
- La figura 37 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*, antes del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas.
- La figura 38a es el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* antes del tratamiento con amidasa de *Dictyostelium discoideum*.
- 25 La figura 38b es el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* después del tratamiento con amidasa de *Dictyostelium discoideum*.
- La figura 39 es una vista ampliada de una región de la figura 38b.
- La figura 40 es el espectro de RMN-<sup>1</sup>H 2D-NOESY de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* después del tratamiento con amidasa de *Dictyostelium discoideum*.
- 30 La figura 41 es una representación esquemática de la etapa de defosforilación de la fosfatasa alcalina del esquema de reacción de conjugación.
- La figura 42 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*, después del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas.
- 35 La figura 43 es una representación esquemática de la etapa de incorporación de engarce de cistamina del esquema de reacción de conjugación.
- La figura 44 es el espectro de EC-EM de LPS O-deacilado de cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis*, después del tratamiento con amidasas de *Dictyostelium discoideum* aisladas y después de la incorporación de engarce de cistamina.
- 40 La figura 45a es el espectro de MALDI-EM de la proteína CRM<sub>197</sub>.
- La figura 45b es el espectro de MALDI-EM de la proteína CRM<sub>197</sub> tras la activación de bromoacetilo.
- La figura 46 es la representación esquemática de la etapa de conjugación del esquema de reacción de conjugación.
- La figura 47 es un análisis de SDS-PAGE de CRM<sub>197</sub> (carril 2), CRM<sub>197</sub> bromoacetilada (carril 3), conjugado (carril 4), escalera de peso molecular (carril 1).
- 45 La figura 48 es un ELISA de suero de conejo tras la inmunización frente a LPS purificado de *N. meningitidis* según se indica.

La figura 49 es un ensayo bactericida usando sueros pre-inmunización y tras la inmunización de conejo número 2 vacunado con cepas MC58 *galE* y MC58 de *Neisseria meningitidis*.

#### Descripción de las realizaciones preferidas

5 A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o realización de pruebas de la presente invención se puedan usar cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación.

10 Se divulgan en el presente documento enzimas novedosas, procedimientos novedosos y estructuras antigénicas útiles en producir vacunas y compuestos útiles en combatir bacterias gram-negativas. Se aislaron enzimas a partir del moho del fango *Dictyostelium discoideum* y se usaron para degradar específicamente lipopolisacárido (LPS). La degradación enzimática permite a los residuos de la molécula de LPS, incluyendo epítomos inmunogénicos de la parte oligosacáridica de núcleo de LPS, permanecer sin modificar durante está renovación enzimática de ácidos grasos de la región lipídica A de la molécula de LPS.

15 También se divulgan estrategias empleadas para obtener y purificar actividades enzimáticas deseadas bien directamente a partir de *Dictyostelium discoideum* o bien tras la clonación y expresión en un sistema de expresión apropiado y usos de enzimas aisladas de esta manera.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un procedimiento de preparar una vacuna que comprende:

- 20           separar el lipopolisacárido a partir de una bacteria de interés;
- desesterificar el lipopolisacárido;
- retirar al menos un ácido graso N-ligado del lipopolisacárido con una actividad amidasa aislada; y
- conjuguar el lipopolisacárido modificado con una molécula transportadora adecuada.

25 La bacteria es preferentemente una bacteria gram-negativa. Como se apreciará por un experto en la técnica, la bacteria puede no ser necesariamente una bacteria conocida o una bacteria positivamente identificada sino que solamente necesita estar suficientemente purificada o aislada de tal modo que el lipopolisacárido pueda recuperarse a partir de la misma.

Como se usa en el presente documento, "purificado" no requiere pureza absoluta, sino solamente que el material se haya purificado, por ejemplo, a 2 veces, a 5 veces, a 10 veces o más.

30 Como se usa en el presente documento, "aislado" requiere que el material en cuestión se haya sacado de su entorno natural.

35 En una realización preferida, la actividad amidasa es a partir de un péptido que tiene al menos identidad del 70 % con la secuencia de aminoácidos según se expone bien en SEC ID N.º: 1 (FAAI/Dd1) o bien en SEC ID N.º: 2 (FAAI/DD2). En otras realizaciones, el péptido puede tener al menos identidad del 75 %, al menos identidad del 80 %, al menos identidad del 85 %, al menos identidad del 90 % o al menos identidad del 95 % con la secuencia de aminoácidos como se expone bien en la SEC ID N.º: 1 o bien en la SEC ID N.º: 2 o es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone bien en la SEC ID N.º: 1 o bien en la SEC ID N.º: 2.

40 Se observa que la actividad de amidasa está aislada, significando que se ha aislado o purificado a partir del organismo huésped, como se comentó anteriormente. Específicamente, se observa que el organismo huésped puede ser un organismo que tiene actividad amidasa nativa tal como *Dictyostelium discoideum* o puede ser un organismo que comprende un sistema de expresión dispuesto para expresar bien Dd1 (SEC ID N.º: 1) o bien DD2 (SEC ID N.º: 2) como se discute más adelante.

45 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de LPS mono-N-acilada-de-O-acilada aislada o una molécula de LPS de-N-acilada-de-O-acilada a partir de una bacteria de interés conjugada a una proteína transportadora. La molécula de LPS mono-N-acilada-de-O-acilada o la molécula de LPS de-N-acilada-de-O-acilada puede ser de cualquier bacteria gram-negativa, por ejemplo, pero no limitada a *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Mannheimia haemolytica*, como se muestra en las figuras 3b, 3c y 3d. En otras realizaciones, el conjugado se puede usar para la inmunización de individuos en necesidad de tal tratamiento, es decir, individuos que tienen o sospechosos de tener o en riesgo de desarrollar una infección por la bacteria de

50 interés.

Como se discute más adelante, los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la forma aislada de la amidasa es capaz de modificar o reaccionar con sustratos (LPS a partir de cepas bacterianas específicas) que no son sustratos para el organismo intacto (*Neisseria meningitidis* y *Mannheimia haemolytica*). Como se muestra en las figuras 3b, 3c y 3d, la actividad de amidasa trabaja sobre una variedad de sustratos O-deacilados, incluyendo LPS de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Mannheimia haemolytica*.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporciona un LPS O-deacilado soluble en agua, purificado que tiene al menos un ácido graso N-ligado retirado. El LPS puede ser de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Mannheimia haemolytica*, que se muestran en figuras 3b, 3c y 3d. En otras realizaciones, se proporciona un LPS aislado, como se describe anteriormente conjugado con un vehículo adecuado.

En algunas realizaciones, el LPS se separa de, se aísla de o se recupera de la bacteria de interés usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por una extracción con fenol y con tratamiento con DNasa, RNasa y proteinasas. Se pueden usar también otros medios adecuados conocidos en la técnica.

El LPS puede desesterificarse usando cualesquiera medios adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, enzimáticamente o por tratamiento con una base adecuada, por ejemplo pero no limitada a hidrazina, NaOH leve, KOH o similares.

El LPS modificado puede recuperarse por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, haciendo pasar el material a través de una columna de giro de 10 kDa y después separar adicionalmente en una columna de cromatografía Sephadex G-10. Se observa que tales procedimientos para recuperar una fracción de un tamaño específico se conocen bien por aquellos expertos en la técnica.

Los procedimientos de conjugación y las proteínas transportadoras adecuadas se tratan en mayor detalle más adelante.

En otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento de recuperar un lipopolisacárido modificado a partir de una bacteria de interés que comprende:

separar el lipopolisacárido a partir de la bacteria de interés;

desesterificar la capa de lipopolisacárido;

retirar al menos un ácido graso N-ligado del lipopolisacárido con una actividad amidasa aislada; y

recuperar el LPS modificado.

En estas realizaciones, se recuperó un LPS modificado que es soluble en agua ya que al menos uno de los dos ácidos grasos N-ligados se ha retirado y el LPS se ha O-deacilado. De forma más importante sin embargo, los componentes de núcleo importantes de los LPS están intactos y mantienen sustancialmente su conformación o estructura nativa, según se describe más adelante. Además, el LPS modificado es más susceptible a etapas de conjugación subsiguientes, como se trata en el presente documento.

*Dictyostelium discoideum* es una ameba que vive en el suelo que produce tanto esterasas como amidasas, que tienen el efecto degradador específico en LPS que se requiere [Verret, CR; Rev. Infect. Dis (1984) 6: 452-454]. En el entorno natural *Dictyostelium discoideum* se alimenta de LPS bacteriano, engullendo el organismo, retirando los ácidos grasos en el lípido A como su fuente de alimento sin modificación alguna para los grupos de carbohidratos.

Otros investigadores [Gustafson y cols. publicación de la solicitud de los EE.UU. N.º: 2003/0138448 A1] han propuesto usar la especie *Dictyostelium discoideum* intacta para degradar especies bacterianas intactas con la molécula de LPS deacilada purificándose a partir de esta mezcla. Sin embargo ciertas especies bacterianas no pueden dar soporte eficientemente al crecimiento de *Dictyostelium discoideum*, incluyendo *Neisseria meningitidis*. El crecimiento de *Dictyostelium discoideum* se examinó usando diversas cepas bacterianas como fuentes de alimento. Las células de *Dictyostelium discoideum* se plaquearon en un césped de cada una de las siguientes cepas bacterianas, L3 de *Neisseria meningitidis* encapsuladas, L3 de *Neisseria meningitidis* no encapsuladas, L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* encapsuladas, 1003 *lic1 lpsA* de *Haemophilus influenzae*, 1003 *lic1lpt6* de *Haemophilus influenzae*, 162 de *Haemophilus influenzae*, *losB* de *Mannheimia haemolytica* y *Klebsiella aerogenes* en medios SM y de chocolate. El crecimiento de *Dictyostelium discoideum* en *Klebsiella aerogenes* y *Haemophilus influenzae* fue normal. Sin embargo, el crecimiento en *Neisseria meningitidis* estando encapsulada o no y en *Mannheimia haemolytica* estaba gravemente inhibido y por lo tanto la molécula de LPS deacilado deseado de *Neisseria meningitidis* y de *Mannheimia haemolytica* no se produciría de forma efectiva utilizando las últimas metodologías.

Como se ilustra en el presente documento fue por lo tanto inesperado que a pesar de que *Dictyostelium discoideum* no podría crecer directamente en *Neisseria meningitidis* y *Mannheimia haemolytica*, las enzimas producidas por

*Dictyostelium discoideum* fueron capaces de degradar los derivados purificados de LPS de *Neisseria meningitidis* y de *Mannheimia haemolytica* que se proporcionaron como sustratos con la especificidad requerida.

Las enzimas reveladas en el presente documento tienen actividad específica sobre residuos en la región de lípido A de la molécula de LPS como se ilustra en la fig. 4.

5 *Dictyostelium discoideum* actúa sobre la región de lípido A del LPS en una manera secuencial que utiliza inicialmente esterasas para eliminar los ácidos grasos unidos a éster y después FAAI usa este sustrato O-deacilado para eliminar el ácido graso N-ligado del residuo GlcN-I y después a su vez, FAAIL usa el producto de FAAI como su sustrato para eliminar el ácido graso N-ligado del residuo GlcN-II. Todos estos procedimientos enzimáticos degradativos son específicos y no causan modificación alguna al resto de la molécula LPS. Los autores de la presente invención preparan LPS-OH, ahora conteniendo solamente los ácidos grasos unidos a amida y añaden esto al sobrenadante tras la incubación de células de *Dictyostelium discoideum* con células de *Klebsiella aerogenes* muertas. *Klebsiella aerogenes* es la bacteria usada más comúnmente como el sustrato para el crecimiento de *Dictyostelium discoideum* usado en la técnica. La incubación del sobrenadante con el LPS-OH durante 16 h a 22 °C y la purificación subsiguiente, como se detalla en los ejemplos, proporciona moléculas de-N-aciladas que son fácilmente susceptibles a las manipulaciones subsiguientes de nuestras estrategias de conjugación y de la forma más importante contienen la región de oligosacáridos de núcleo conservado con ninguna alteración en su estructura. Sin la retirada enzimática del/de los ácido(s) graso(s) N-ligado(s) queda una molécula anfifílica que es difícil de manipular y produce glucoconjugados a partir de ella.

20 En una realización de la invención se proporcionan secuencias de aminoácidos para las dos amidasas de ácidos grasos producidas por *Dictyostelium discoideum* (fig. 5): Dd1 (SEC ID N.º: 1) y Dd2 (SEC ID N.º: 2). Estas secuencias de aminoácidos se identificaron como amidasas debido a la presencia de una secuencia consenso aminoácida en ambas proteínas, mostrada en la figura 6. Como se muestra en la figura 6, estos péptidos muestran homología considerable a amidasas de ser humano, de rata y de *Arabidopsis*, en particular en la región de firma de amidasa y más específicamente en el motivo GGSS (G/A/S)G conservado dentro de la región de firma de amidasa. Se entenderá que una secuencia de aminoácidos puede incluir variantes tales como aminoácidos modificados químicamente, aminoácidos no naturales, etc.

30 En una realización de la invención se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos deducidas de las secuencias de aminoácidos según se exponen en la SEC ID N.º: 1 o en la SEC ID N.º: 2, producidas las dos amidasas de ácidos grasos por *Dictyostelium discoideum*. Las secuencias genómicas se muestran en la fig. 7 (SEC ID N.º: 3) y en la fig. 8 (SEC ID N.º: 4). Como se apreciará por un experto en la técnica, estas secuencias de nucleótidos pueden usarse como sondas para el rastreo de bibliotecas o similares, para la generación de cebadores, o para la expresión de amidasas de ácidos grasos recombinantes, como se trata más adelante. Será fácilmente patente para alguien experto en la técnica que se puede usar cualquier sistema de expresión adecuado.

35 En una realización de la invención se proporciona un procedimiento para utilizar la actividad de amidasa aislada en el LPS O-deacilado aislado para producir moléculas (figuras 9-16) que son carbohidratos que conservan la naturaleza antigénica del sustrato nativo y son útiles en inducir, en un mamífero, una respuesta inmunitaria contra una bacteria gram-negativa. Las moléculas de las figuras 9-16 son los productos tanto de tratamientos químicos como de tratamientos enzimáticos. Todos los restos unidos a ésteres se han retirado de la molécula de LPS aislada en la etapa química y subsiguientemente la etapa enzimática se ha usado para eliminar uno o ambos de los ácidos grasos unidos a amidas. La molécula así producida conserva el disacárido de glucosamina fosforilado del lípido A pero ha perdido los ácidos grasos unidos a ésteres y uno o ambos de los ácidos grasos unidos a amidas, esto vuelve a la molécula completamente no tóxica. Los oligosacáridos de núcleo han perdido cualesquiera restos unidos a éster pero no se han modificado en cualquier otra forma. Esta molécula mantiene los epítomos antigénicos que están conformados de forma idéntica según están en la superficie de la célula bacteriana, ya que los anticuerpos monoclonales para las estructuras de LPS nativas y las células bacterianas completas también reconocen las moléculas representadas en las figuras 9-16.

En una realización de la invención se proporciona un producto derivado de LPS obtenible por actividad de al menos una de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente y se proporcionan usos de las mismas como antígenos y en la elaboración de vacunas.

50 En una realización de la invención se proporciona una molécula de lipopolisacárido ("LPS") modificado en la que al menos un ácido graso N-ligado se ha retirado sin modificación de los residuos antigénicos en el núcleo interno. Las moléculas O-deaciladas químicamente y N-deaciladas enzimáticamente ejemplos ejemplares de las cuales se muestran en las figuras 9-16 se utilizan después en estrategias de conjugación por lo que se unen en última instancia a una proteína transportadora.

55 En una realización de la invención se proporciona una molécula de LPS modificado anteriormente en la que al menos el grupo fosfato glucosídico del lípido A se ha eliminado también.

En una realización de la invención se proporciona una molécula de LPS modificada sustancialmente libre de ácidos grasos unida a la región de lípido A y que tiene un engarce unido a un grupo aldehído. El grupo aldehído se habrá hecho disponible preferentemente por retirada de un grupo fosfato. La generación del grupo aldehído crea una funcionalidad específica disponible para conjugación más allá de los epítomos antigénicos del oligosacárido de núcleo.

En algunos casos la molécula de carbohidratos se puede unir a una proteína transportadora por medio de una molécula de engarce. La molécula de engarce puede ser pero no está restringida a escuarato, cistamina, 3-maleimidopropionato de N-succinimidilo, dihidrazida de ácido adípico, ácido  $\epsilon$ -aminohexanoico, dimetilacetal clorohexanol, D-glucuronolactona y *p*-nitrofenilamina. Como será patente para alguien de habilidad en la técnica, se pueden usar otras moléculas de engarce adecuadas.

En una realización se elige cistamina como el enlazador ya que termina con un resto de tiol que facilitaría conjugación por medio de química del azufre y por lo tanto no implicaría a ninguno de los grupos amino en la molécula de carbohidrato, la modificación de lo cual alteraría epítomos antigénicos en el glucoconjugado derivado.

Esta proteína transportadora puede ser, pero no está restringida a CRM<sub>197</sub>, toxoide tetánico (TT), toxoide de difteria, ASH, BSA, toxina A de *P. aeruginosa*, toxina/toxoide de cólera, toxina pertúsica, exotoxinas/toxoide de *Clostridium perfringens*, antígeno de superficie de hepatitis B, antígeno de núcleo de hepatitis B, proteína VP 7 de rotavirus, poliepítipo N19, proteínas F y G del virus respiratorio sincitial. Como será patente para alguien experto en la técnica, se pueden usar otras proteínas transportadoras adecuadas.

En algunos casos la proteína transportadora puede activarse. Los agentes de activación incluyen pero no están restringidos a éster di-N-hidroxisuccinimida de ácido 3,3'-ditiodipropiónico (DTSP) y N-succinimidil-bromo-acetato. Como será patente para alguien experto en la técnica, se pueden usar otros agentes activadores adecuados.

En una realización de la invención se proporciona un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero que comprende administrar un antígeno que comprende una molécula de LPS modificada sustancialmente libre de ácidos grasos a la región de lípido A.

El glucoconjugado se administra después a un mamífero en presencia de un coadyuvante. Los coadyuvantes a utilizarse incluyen pero no están restringidos a alumbre, MF59 (escualeno) y arqueosomas. Como será patente para alguien experto en la técnica, se pueden usar otros coadyuvantes adecuados.

Especies bacterianas y las enfermedades que causan que pueden tomarse como objetivo por una estrategia tal incluyen, pero no están restringidas a *Neisseria meningitidis* (meningitis), *Haemophilus influenzae* (otitis media), *Mannheimia haemolytica* (pasteurelosis neumónica ovina y bovina (fiebre del transporte) y septicemia ovina), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleuroneumonía necrotizante fibrinohemorrágica porcina) y *Pasteurella multocida* (cólera aviar de las aves, septicemia hemorrágica bovina, rinitis atrófica porcina). Los anticuerpos generados para el glucoconjugado de inmunización serían dependientes de células T y tendrían memoria inmunológica, de tal forma que cuando el antígeno bacteriano específico se expone al sistema inmune una respuesta rápida de anticuerpos facilitaría el reconocimiento y la matanza del antígeno extraño.

La invención se ilustrará ahora por medio de ejemplos. Sin embargo, se entiende que los ejemplos son para propósitos ilustrativos y no son necesariamente limitantes.

#### **Ejemplo 1: capacidad de *Dictyostelium discoideum* para crecer sobre varias bacterias gram-negativas.**

Varias bacterias gram-negativas se cultivaron en agar de chocolate y placas de medios SM y se sembró *Dictyostelium discoideum* en la esquina de cada placa y se incubó a 22 °C con el fin de observar si el cultivo de bacterias podría soportar el crecimiento de *Dictyostelium*. Según muestra la tabla 1 *Neisseria meningitidis*, estando o no encapsulada y *Mannheimia haemolytica* fueron incapaces de respaldar el crecimiento mientras que *Klebsiella aerogenes* y *Haemophilus influenzae* fueron capaces de respaldar el crecimiento.

Tabla 1. Crecimiento de *Dictyostelium* sobre células bacterianas gram-negativas

| <u>Bacterias</u>                                                                                                                               | <u>Medios</u> | <u>Crecimiento</u> <sup>1</sup> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------|
|                                                                                                                                                |               |                                 |
| <i>Neisseria meningitidis</i> L3 <i>galE</i>                                                                                                   | SM            | *                               |
|                                                                                                                                                | Chocolate     | -                               |
| <i>Neisseria meningitidis</i> L3 encapsuladas                                                                                                  | SM            | *                               |
|                                                                                                                                                | Chocolate     | -                               |
| <i>Neisseria meningitidis</i> L3 no encapsuladas                                                                                               | SM            | *                               |
|                                                                                                                                                | Chocolate     | -                               |
| <i>Haemophilus influenzae</i> 1003 <i>lic1 lpsA</i>                                                                                            | SM            | *                               |
|                                                                                                                                                | Chocolate     | +++                             |
| <i>Haemophilus influenzae</i> 1003 <i>lic1 lpt6</i>                                                                                            | SM            | *                               |
|                                                                                                                                                | Chocolate     | ++                              |
| <i>Haemophilus influenzae</i> 162                                                                                                              | SM            | *                               |
|                                                                                                                                                | Chocolate     | ++                              |
| <i>Mannheimia haemolytica losB</i>                                                                                                             | SM            | +/-                             |
|                                                                                                                                                | Chocolate     | +/-                             |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>                                                                                                                    | SM            | +++                             |
|                                                                                                                                                | Chocolate     | +++                             |
| +++ , crecimiento excelente; ++ , crecimiento; + , crecimiento pobre; - , ningún crecimiento; * ningún crecimiento bacteriano en estos medios. |               |                                 |

**Ejemplo 2: amidasas de ácidos grasos (FAAI y FAII) y los genes que codifican FAAI y FAII deducidos a partir de la secuencia genómica de *Dictyostelium discoideum*.**

- 5 Se identificaron dos amidasas de ácidos grasos a partir del genoma de *Dictyostelium discoideum* (figuras 5a (SEC ID N.º: 1) y 5b (SEC ID N.º: 2)) en virtud de sus secuencias de amidasa consenso fig. 6). Análisis de BLASTp reveló que Dd1 y Dd2 eran homólogos a amidasa de mamífero (humana), (Dd1: idéntica al 27 %, similar al 42 %; DD2: idéntica al 32 %, similar al 43 %). Adicionalmente se encontró que Dd1 y Dd2 son idénticos al 22 % y similares al 41 % entre sí. La comparación de alineamiento entre *Dd1*, *Dd2* y amidasa humana se determinó usando un programa de software informático multalign (F. Corpet, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890) y se muestra en la fig. 6.

Las secuencias de ADN genómico para los dos genes son como se muestran en las figuras 7 (SEC ID N.º: 3) y 8 (SEC ID N.º: 4).

**Ejemplo 3: clonación y expresión de gen *Dd1* en *Escherichia coli*.**

- 15 Se obtuvo gen *Dd1* por PCR usando ADN genómico de *Dictyostelium* como plantilla. Los cebadores específicos de genes usados fueron

NRC 191 (5' CTCGAGAATAGATTAACAAATATATCAAAAATTAGAAAATC 3') (SEC ID N.º: 5) y

NRC 192 (5' GTCGACTTATTTTAAATAATTTGGTGTAAAGTGATGTAAAATC 3') (SEC ID N.º: 6).

- 20 NRC 191 y NRC 192 introducen sitios de restricción XhoI en el extremo 5' final y Sall en el extremo 3' respectivamente del gen *Dd1*. Los sitios de restricción se diseñaron para clonar el gen *Dd1* dentro del vector de expresión de proteínas pNRC71. Las condiciones de PCR usadas amplificando el gen *Dd1* fueron como sigue: -

Desnaturalización - 92 °C durante 30 segundos

Fusión - 52 °C durante 1 minuto

Extensión - 68 °C durante 2 minutos

Durante 25 ciclos con una etapa de extensión final durante 10 minutos a 68 °C.

- 5 El producto de PCR obtenido con el grupo de cebadores anterior se clonó dentro del plásmido pCR2.1 (kit de clonación de TA, Invitrogen) y se transformó en cepa TOP10F' de *E. coli* (Invitrogen). Los clones correctos obtenidos con inserto génico Dd1 se sometieron a digestión de restricción con XhoI/Sall y se clonaron dentro del vector de expresión de proteínas pNCR71 (que codifica el sitio de escisión de trombina de la proteína de unión a maltosa (MBP)-His 6X en el extremo N-terminal de la proteína de fusión) y se transformaron en células de cepa BL21 de *E. coli* (Novagen). La proteína Dd1 recombinante expresada como proteína de fusión de MBP-His 6X (figura 17) se purificó por cromatografía de afinidad de resina de amilosa usando sistema de cromatografía BioLogic de BioRad. La proteína de fusión purificada que contiene MBP y una marca de His 6X en el extremo N-terminal se digirió proteolíticamente con trombina. La proteína MBP escindida por trombina que contiene la marca His 6X se retiró haciendo pasar la muestra en una columna Ni-NTA por cromatografía de afinidad. El flujo continuo contenía proteína Dd1 pura. La proteína recombinante sobreexpresada se confirmó por análisis de prueba de bandas de western usando anticuerpo antipolihistidina (Sigma) (fig. 18a).

#### Clonación y expresión de proteína de fusión Dd1( $\Delta$ 1-11) MBP.

- Como la proteína de fusión Dd1-MBP recombinante de longitud completa se expresó como una proteína insoluble en cuerpos de inclusión de *E. coli*, lo que requirió procedimientos de solubilización adicionales extrayendo la proteína, se adoptó otro enfoque alternativo produciendo una proteína de fusión Dd1-MBP truncada que carece de los primeros 11 aminoácidos. La proteína Dd1 truncada que carece de los primeros 11 aminoácidos en el extremo N-terminal se clonó como la proteína de fusión MBP-His 6X. Los cebadores específicos del gen NRC197 (5' CTCGAGAAATCATTAAATAGATGGAAAA 3') (SEC ID N.º: 7) y NRC 198 (5' GTCGACTTATTTTAAATAATTTGGTGT 3') (SEC ID N.º: 8) se usaron amplificando el gen por PCR usando ADN genómico de *Dictyostelium* como plantilla. Las condiciones de PCR usadas fueron las mismas que las usadas anteriormente amplificando el gen Dd1 de longitud total. NRC 197 y NRC 198 introducen sitios de restricción XhoI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3' respectivamente del gen *Dd1*. Los sitios de restricción se diseñaron para clonar el gen *Dd1* dentro del vector de expresión de proteínas pNCR71.

- La proteína recombinante obtenida se purificó por cromatografía de afinidad de resina de amilosa usando sistema de cromatografía BioLogic de BioRad. La proteína de fusión purificada que contiene MBP y una marca de His 6X en el extremo N-terminal se digirió proteolíticamente con trombina. La proteína MBP escindida por trombina que contiene la marca His 6X se retiró haciendo pasar la muestra en una columna Ni-NTA por cromatografía de afinidad. El flujo continuo recogido contenía proteína  $\Delta$ 1-11 Dd1 pura. La proteína recombinante sobreexpresada se confirmó por análisis de bandas de western usando anticuerpo anti-polihistidina (Sigma) (fig. 18b).

#### 35 Ejemplo 4: clonación y expresión de gen Dd2 en *Escherichia coli* se obtuvieron por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR).

- Las células de *Dictyostelium* cultivadas utilizando como fuente de comida *Klebsiella aerogenes* se recogieron y usaron aislando ARN. Se aisló el ARN total de las células de *Dictyostelium* usando kit RNeasy Midi (Qiagen). El ARN aislado se cuantificó y se usaron  $\mu$ g de ARN en la reacción de transcripción reversa. El cebador específico del NRC 190 (5' GTCGACTTAGTTATTTGGGTTTGTGCAATTTG) (SEC ID N.º: 9) se usó en la reacción de transcripción reversa obteniendo el ADNc. El ADNc obtenido se usó como la plantilla en la PCR subsiguiente amplificando gen Dd2 usando cebadores específicos de gen NRC 189 (5' CATATGCACCACCATCATCACCACACATCTTCTTCATTAAGTAAAAGTAGTA G 3') (SEC ID N.º: 10) y NRC 190. NRC 189 introduce sitio de restricción NdeI así como marca His 6X en el extremo 5' y NRC 190 introduce Sall en el extremo 3' del gen *Dd2*. El producto de PCR obtenido usando el conjunto anterior de cebadores se clonó en el plásmido pCR2.1 (kit de clonación de TA, Invitrogen) y se transformó dentro de *E. coli*/TOP10F' (Invitrogen). Los clones correctos obtenidos con el inserto His<sub>6</sub>-Dd2 se sometieron a digestión de restricción con NdeI/Sall y se clonaron dentro del vector pCW-MaIET, que codifica sitio de escisión de MBP-trombina en el extremo N-terminal de la proteína *Dd2*. La proteína *Dd2* recombinante expresada como proteína de fusión de MBP-His 6X (figura 19) se purificó por cromatografía de afinidad de resina de amilosa usando sistema de cromatografía BioLogic de BioRad. La proteína de fusión purificada que contiene MBP en el extremo N-terminal de *Dd2* se retiró escindiendo la proteína de fusión purificada con trombina. La proteína recombinante *Dd2* que contiene una marca His 6X en el extremo N-terminal se separó de MBP escindida y se hizo pasar en una columna Ni-NTA por cromatografía de afinidad y el perfil de elución se examinó por un gel teñido de Coomassie (fig. 20).

#### 55 Ejemplo 5: actividad amidasa de Dd1 y 2 recombinante.

La actividad enzimática de los homólogos de amidasa de ácidos grasos *Dd1* y *Dd2* se estableció usando araquidonil-*p*-nitroanilina de sustrato sintético (Cayman chemical, EE.UU.) (fig. 21).

La actividad enzimática usando sustrato sintético se determinó realizando un seguimiento de la liberación de *p*-nitroanilina a 382 nm ( $E = 13500 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en un espectrofotómetro de ultravioleta-visible. La actividad amidasa de *Dd1* y *Dd2* se confirmó iniciando la reacción añadiendo 10  $\mu\text{l}$  de proteínas recombinantes *Dd1* o 2 (1 mg/ ml en 20 mM Tris pH 7,4) a 160  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción (Tris a pH 8,0 125 mM y EDTA 1 mM) seguido por la adición de 20  $\mu\text{l}$  de sustrato (10 mg/ml en DMSO al 75 %). *Dd1* y *Dd2* expresados recombinantemente causaron ambos la liberación de *p*-nitroanilina según se revela por la formación de un color amarillo en reacción con el sustrato sintético.

#### **Ejemplo 6: producción de antisueros frente a proteína *Dd2* recombinante y análisis de expresión in vivo de *Dd2* en células de *Dictyostelium*.**

Se desarrolló antisuero policlonal (NRC-*Dd2*) contra proteína *Dd2* recombinante expresada en *E. coli*. Se purificó la proteína recombinante expresada como proteína de fusión de MBP-6X His por cromatografía de afinidad de resina de amilosa. MBP presente en el extremo N-terminal de la proteína purificada se retiró por escisión con trombina. La proteína libre de MBP se separó haciéndola pasar en una columna Ni-NTA y la proteína pura obtenida se usó inmunizando conejos blancos Nueva Zelanda (100  $\mu\text{g}$  por inmunización los días 0, 14 y 28). Los antisueros policlonales obtenidos reconocieron una proteína de 70 kDa en lisados celulares de *Dictyostelium*, que es el tamaño esperado de la proteína traducida (figura 22).

Más específicamente los antisueros también fueron capaces de bajar la proteína de 70 kDa in vivo del sobrenadante purificado activo de amidasa de lisados celulares de *Dictyostelium* por inmunoprecipitación. La secuencia de proteína inmunoprecipitada se confirmó según el análisis de secuencia de aminoácidos de la amidasa de 70 kDa por EM de MALDI-TOFF tras escisión y digestión con tripsina de la banda específica a partir de un gel teñido con Coomassie (fig. 23), confirmando que la *Dd2* recombinante es la proteína de amidasa.

#### **Ejemplo 7: sobreexpresión de *Dd1* y *Dd2* en *Dictyostelium*.**

Debido a que *Dd1* y *Dd2* son enzimas eucariotas, que cuando se sobreexpresan en *E. coli* pueden no ser óptimamente funcionales debido a la necesidad de modificación postraducciona o de cualesquiera otros factores activadores presentes en el huésped para completar actividad, se utilizan preferentemente vectores de sobreexpresión de *Dictyostelium discoideum* expresando *Dd1* y *Dd2* en *Dictyostelium discoideum* en sí mismo. Se obtuvo gen *Dd1* por PCR usando ADN genómico de *Dictyostelium* como plantilla. Los cebadores específicos de genes usados fueron

NRC 193

**(5' GAATTCATGAATAGATTAACAAATATATCAAAAATTAGAAAATC 3') (SEC ID N.º: 11) y**

NRC194

**(5' AAGCTTTTAGTGATGATGGTGATGATGTTTAAATAATTTGGTGTAAGTGAT 3') (SEC ID N.º: 12).**

NRC 193 y 194 introducen sitios de restricción EcoRI en el extremo 5' y sitios de restricción HindIII en el extremo 3' respectivamente del gen *Dd1*. Los sitios de restricción se diseñaron para clonar el gen de *Dd1* dentro del vector de expresión de proteínas de *Dictyostelium* pDEXRH.

El gen *Dd2* se amplificó por PCR usando ADNc de *Dd2* obtenido por transcripción reversa de ARNm de células de *Dictyostelium* usando cebador específico de gen NRC 190 (5' GTCGACTTAGTTATTTGGGTTTGTGCAATTTG 3') (SEC ID N.º: 9). Para PCR se usaron cebadores de amplificación NRC195

**(5' AAGCTTATGACATCTTCTTCATTAAGTAAAAGTAG 3') (SEC ID N.º: 13) y NRC196**

**(5' AAGCTTTTAGTGATGATGGTGATGATGTTTAAATAATTTGGTGTAAGTGAT 3') (SEC ID N.º: 14).** NRC195 y 196 introducen sitios de restricción HindIII tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' del gen, lo que permite clonar gen *Dd2* en vector pDEXRH vector en sitio HindIII. Ambos genes *Dd1* y *Dd2* se clonaron en el vector pDEXRH de expresión de proteínas de *Dictyostelium* y se transformaron en *Dictyostelium*. El nivel de expresión de la proteína recombinante es muy bajo. Alternativamente, *Dd1* y *Dd2* también se clonan con una marca His 6X en el extremo N-terminal en el vector pVS4. Una ventaja de usar vector pVS4 de *Dictyostelium discoideum* es que codifica un péptido señal secretor escindible en el extremo N-terminal de la proteína de fusión. Por este procedimiento la proteína sobreexpresada que se secreta en el medio de cultivo se purifica fácilmente usando cromatografía de afinidad Ni-NTA.

**Ejemplo 8: aislamiento y actividad de FAAl directamente a partir de *Dictyostelium discoideum*.**

*Dictyostelium discoideum* se cultivó a fase logarítmica ( $3 \times 10^6$  células/ml) en medios líquidos AX2 (pH 6,7; 7,15 g/l de extracto de levadura, 14,3 g/l de peptona, 18,6 g/l de maltosa, 0,486 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,616 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Las células se recogieron y se lavaron dos veces con PBS e inmediatamente se suspendieron en PBS con células de *Klebsiella aerogenes* matadas con fenol y células de *Klebsiella aerogenes* lavadas con PBS continuando su cultivo, utilizando ahora *Klebsiella aerogenes* como una fuente de alimento con LPS O-deacilado (LPS-OH) suministrado como un sustrato adicional.

Cuando *Dictyostelium discoideum* se dejó crecer en presencia de *Klebsiella aerogenes* durante 24 horas, se esperó que produjera actividad amidasa. La proporción del número de células bacterianas y de células de *Dictyostelium discoideum* que optimizaron N-deacetilación del sustrato de LPS-OH purificado se estandarizaron a  $1 \times 10^{11}$  frente a  $5 \times 10^7$  células/ml respectivamente.

Por lo tanto utilizando estas enzimas durante el crecimiento de *Dictyostelium discoideum*, se añadió LPS-OH aislado de la bacteria gram-negativa mutante de inmunotipo L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* a la mezcla de *Klebsiella aerogenes*/*Dictyostelium discoideum*.

Los productos esperados tras incubación de LPS-OH de L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* con el sobrenadante de crecimiento de *Dictyostelium discoideum* y *Klebsiella aerogenes* se detallan en las figuras 9 y 10 y esto se confirma cuando el material de partida y los productos de reacción se examinaron por electropulverización de electroforesis capilar-espectrometría de masas (EC-ES-EM) (fig. 24).

En algunos casos será preferible mantener el segundo ácido graso N-ligado, aunque la estructura que carece de este segundo ácido graso puede desearse aún en algunas situaciones. Para uso en preparar una vacuna, se puede preferir la estructura que contiene un segundo ácido graso.

Tras 24 horas de incubación de LPS-OH de L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* en la suspensión de *Dictyostelium discoideum* y *Klebsiella aerogenes* a 22 °C con agitación, las células se sedimentaron y el sobrenadante se liofilizó y se examinó por EC-ES-EM (fig. 24).

El ion cargado doblemente a  $m/z$  1018,7<sup>2-</sup> y el ion cargado triplemente a 678,9<sup>3-</sup> corresponde a un peso molecular de 2039,4 u.m.a. consistente con la composición 2 GlcN, 1 FA, 2P, 2Kdo, 2Hep, GlcNAc, PEtn según se ilustra en la representación esquemática anterior. El ion cargado doblemente a  $m/z$  905,4<sup>2-</sup> corresponde a la pérdida del segundo residuo de ácido graso de la región de lípido A.

El producto de la exposición de LPS-OH de L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* a la suspensión de *Dictyostelium discoideum*/*Klebsiella aerogenes* tiene por lo tanto un peso molecular de al menos 225 u.m.a. menor que el sustrato LPS-OH. Esto es consistente con la ausencia de un ácido graso N-ligado (ácido 3-hidroximirístico) a partir de la región de lípido A de la molécula.

Esto se confirmó mediante una técnica de espectrometría de masas en tándem, que puede específicamente fragmentar iones seleccionados a partir del espectro de masas primario. La naturaleza de LPS-OH y de moléculas derivadas es tal que la fragmentación está potenciada entre la región de lípido A y la molécula de oligosacárido de núcleo, con el tamaño de la región de lípido A fragmentada indicado en el espectro de masas resultante. De esta manera se puede comparar el tamaño de la región de lípido A de LPS-OH intacto al aquel del producto de exposición de LPS-OH a la suspensión de *Dictyostelium discoideum*/*Klebsiella aerogenes*.

Como ilustra la fig. 25, una molécula de LPS-OH intacta se fragmenta dando iones para la región de lípido A de  $m/z$  95<sup>2-</sup> y 475<sup>2-</sup>. Estos iones de  $m/z$  95<sup>2-</sup> y 475<sup>2-</sup> corresponden a dos azúcares de glucosamina, dos grupos fosfato y dos restos de ácidos grasos N-ligados.

Sin embargo, el análisis de EM/EM del ion doblemente cargado a  $m/z$  1018,7<sup>2-</sup> a partir de la molécula de LPS-OH expuesta a *Dictyostelium discoideum*/*Klebsiella aerogenes* (fig. 26) causa fragmentación dando una carga individual para la región de lípido A de  $m/z$  725<sup>-</sup>. Este ion de  $m/z$  725<sup>-</sup> corresponde a dos azúcares de glucosamina, dos grupos fosfato y un resto de ácido graso N-ligado, ilustrando así que se ha retirado un ácido graso de la región de lípido A del LPS-OH tras la exposición a la suspensión de *Dictyostelium discoideum*/*Klebsiella aerogenes*. El oligosacárido de núcleo está aún completamente intacto según se indica por la carga iónica individual  $m/z$  1311,6 que corresponde a una composición de 2Kdo, 2Hep, PEtn, GlcNAc, Glc y la pérdida de un residuo Kdo (debido a la lábil naturaleza del enlace cetosídico en la etapa de fragmentación de EM) dando el ion cargado individualmente a  $m/z$  1091.

Esta molécula mono-acilada puede aprovecharse para el desarrollo de los glucoconjugados o puede utilizarse como un sustrato para la segunda amidasa FAAl. Este procedimiento induciendo *Dictyostelium discoideum* produciendo la actividad FAAl se ha producido reproduciblemente con varias moléculas de LPS-OH purificadas de diferentes especies incluyendo *Haemophilus influenzae* (fig. 27) y *Mannheimia haemolytica* (fig. 28) tanto tiempo como el

cociente de los números de células de *Dictyostelium discoideum*:*Klebsiella aerogenes* se mantuvo a  $5 \times 10^7$ : $1 \times 10^{11}$  células/ml respectivamente.

Alternativamente la actividad amidasa se aisló directamente a partir de las células de *Dictyostelium* privadas de alimento. Es bien sabido que *Dictyostelium* segrega diversos factores sobreviviendo a condiciones de privación de nutrientes y los autores de la presente invención han observado que también segrega amidasas durante la privación de nutrientes.

Los autores de la presente invención usaron esta amidasa segregada N-deacilando LPS-OH. Utilizando la amidasa segregada durante la privación de nutrientes de *Dictyostelium*, se sometieron a privación de nutrientes  $5 \times 10^7$  células/ml durante 16 horas en tampón de Sorensen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  14,6 mM, pH 6,0) y el sobrenadante que contiene las enzimas secretadas se recogió haciendo sedimentar las células por centrifugación a 2000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se incubó con el sustrato LPS-OH (1 mg/ml) y el producto de-N-acilado se aisló e identificó por EC-EM a partir del mutante de inmunotipo L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* (fig. 29), del mutante *lic1 lpt6* de *Haemophilus influenzae* (fig. 30) y del mutante *losB* de *Mannheimia haemolytica* (fig. 31). De forma similar se ha encontrado que *Dictyostelium* segrega amidasas cuando crece axénicamente. Por lo tanto utilizando la amidasa segregada durante el crecimiento axénico, las células de *Dictyostelium* se separaron del cultivo axénico (medio AX2) cultivado a una densidad celular de  $3 \times 10^6$  células/ml y el sobrenadante de cultivo se usó como la fuente de enzimas con LPS-OH de especies bacterianas gram-negativas. La N-deacilación se confirmó por análisis de EC-EM de los productos de incubación del sobrenadante axénico con mutante de inmunotipo L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* (fig. 32), del mutante *lic1 lpt6* de *Haemophilus influenzae* (fig. 33) y del mutante *losB* de *Mannheimia haemolytica* (fig. 34). Las ventajas de estos procedimientos son la ausencia de moléculas derivadas de *Klebsiella aerogenes* en el sobrenadante.

#### **Ejemplo 9: Producción de un glucoconjugado utilizando LPS O-deacilado de L3 *galE* tras tratamiento por medio de la metodología de *Dictyostelium discoideum*/*Klebsiella aerogenes*.**

Se produjeron glucoconjugados con LPS O-deacilado y con LPS completamente deacilado derivados de *Neisseria meningitidis* en estudios anteriores de nuestro grupo [Cox y cols., 2005]. Los estudios con LPS O-deacilada ilustraron la constatación preliminar de usar glucoconjugados derivados de LPS induciendo una respuesta inmune protectora contra enfermedad meningocócica; sin embargo, debido al carácter hidrófobo de los LPS O-deacilados estos conjugados son difíciles de construir y caracterizar. Subsiguientemente se produjeron glucoconjugados con LPS completamente deacilado que eran mucho más susceptibles a las manipulaciones implicadas en la producción del glucoconjugado, pero no contenían epítomos inmunogénicos cruciales en el oligosacárido de núcleo debido a pérdidas durante las condiciones químicas severas utilizadas deacilando completamente la molécula de LPS. Por esta razón los conjugados derivados por este último procedimiento no indujeron una respuesta inmune protectora para la mayoría de las cepas de tipo silvestre. Se adoptó por lo tanto una nueva estrategia que implica retirada enzimática de al menos un ácido graso N-ligado con la enzima FAAI de *Dictyostelium discoideum* que permite retención de los epítomos oligosacáridos de núcleo inmunogénicos en una molécula soluble en agua que es susceptible a las diversas manipulaciones implicadas en la producción de conjugados (figuras 35 y 36).

#### **Etapas 1: Preparación de LPS-OH.**

LPS se preparó a partir del mutante de inmunotipo L3 *galE* de la cepa MC58 (número 5) de *Neisseria meningitidis* por procedimientos estándar. Este LPS se O-deaciló después produciendo LPS-OH por tratamiento a 37 °C con hidrazina anhidra durante 1 h. LPS-OH se controló en su calidad por análisis del azúcar y EC-ES-EM (fig. 37).

#### **Etapas 2: Degradación por *Dictyostelium discoideum* de LPS-OH.**

Las células de *Dictyostelium discoideum* se prepararon según se describe anteriormente y se añadieron en una proporción apropiada para las células de *Klebsiella aerogenes* muertas según se describe anteriormente. Se añadió LPS-OH a esta suspensión y se dejó a 22 °C durante 24 horas. La suspensión se sedimentó por centrifugación a 10.000 g y el sobrenadante se purificó en una columna de giro (Amicon) con un corte de membrana de 10 kDa. Se recogieron también dos lavados con agua. El flujo a través de material se liofilizó después, se redisolvió en agua y se aplicó a una columna de Sephadex G-25 y se eluyó con agua. Las fracciones de carbonato resultantes se almacenaron y liofilizaron. El material resultante se examinó por EC-ES-EM (fig. 24). El material de partida antes y el producto después del tratamiento con la amidasa aislada se examinó por RMN y dio espectros consistentes con la naturaleza agregante del material de partida (fig. 38a) y la naturaleza soluble en agua del producto (fig. 38b).

Se obtuvo un espectro bien resuelto consistente con una molécula soluble en agua que se produce tras eliminación de al menos un ácido graso N-ligado. El examen de la región anomérica del espectro de RMN- $^1\text{H}$  refuerza esto (fig. 39). Asimismo, la región anomérica del espectro de 2D NOESY (fig. 40) ilustra conectividades de NOE consistentes con el LPS-OH y moléculas de núcleo OS que confirman que la conformación de la región oligosacáridica potencialmente inmunogénica se ha mantenido en este procedimiento.

#### **Etapas 3: Tratamiento con fosfatasa alcalina de LPS-OH tratado de *Dictyostelium discoideum*.**

Se trataron ~ 38 mg de LPS-OH tratado de *Dictyostelium discoideum* con fosfatasa alcalina recombinante (Roche; 700 U/ml a  $t = 0$ , 700 U/ml a  $t = 6$  horas) durante 30 horas a 37 °C con el fin de eliminar los ésteres monofosfato según se ilustra en la fig. 41.

5 La mezcla se hirvió desnaturizando la fosfatasa y se centrifugó (10.000 g, 15 minutos) y el sobrenadante se aplicó a una columna Sephadex G-25 y se eluyó con agua. Las fracciones de carbonato resultantes se almacenaron y liofilizaron. El material resultante se examinó por EC-ES-EM (fig. 42).

El ion doblemente cargado a  $m/z$  1018,7<sup>2-</sup> para el sustrato mono-N-acilado ha perdido claramente bien uno o bien dos residuos de fosfato. El sustrato completamente deacilado ha perdido ambos residuos fosfato dando el ion doblemente cargado  $m/z$  825,5<sup>2-</sup>.

#### 10 **Etapas 4: Unión de engarce de cistamina a producto de *Dictyostelium discoideum* en *galE* de *Neisseria meningitidis*/fosfatasa alcalina.**

Con el fin de unir el producto de *Dictyostelium discoideum* en *galE* de *Nm*/fosfatasa alcalina a una proteína transportadora construyendo el glucoconjugado fue necesario unir una molécula de engarce. Se usó cistamina para este propósito, ya que el engarce utiliza la química del azufre uniendo a la proteína transportadora y no implica utilizar grupos amino de tal forma que el resto de fosfoetanolamina inmunogénica potencialmente no se modificaría durante la reacción de conjugación. Con el fin de garantizar que el engarce de cistamina está unido al grupo aldehído creado por el tratamiento de la fosfatasa alcalina y de evitar reticulación de las moléculas de carbohidrato se hizo reaccionar un gran exceso de cistamina con el resto de carbohidrato, de acuerdo con la fig. 43.

20 Se hicieron reaccionar 25 mg de producto de *Dictyostelium* en *galE* de *Neisseria meningitidis*/fosfatasa alcalina con un exceso molar 30x de cistamina a 37 °C durante 72 horas en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,4. La mezcla de reacción se aplicó después a una columna de Sephadex G-25 y se eluyó con agua. Las fracciones de carbonato resultantes se almacenaron y liofilizaron. El material resultante se redujo con TDT 200 mM en NaHPO<sub>4</sub> 0,1 M a pH 8,1 durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se aplicó después a una columna de Sephadex G-25 y se eluyó con agua. Las fracciones de carbohidratos resultantes se agruparon y liofilizaron y examinaron por EC-ES-EM (fig. 44).

El ion cargado doblemente a  $m/z$  1046,7<sup>2-</sup> y el ion cargado triplemente a  $m/z$  697,5<sup>3-</sup> son consistentes con la adición de la cistamina a la molécula de carbohidratos.

#### **Etapas 5: Activación del transportador proteico.**

30 Con el fin de conjugar la molécula transportadora proteica CRM<sub>197</sub> al carbohidrato marcado con cistamina fue necesario modificar los grupos amino de la proteína CRM<sub>197</sub> por tratamiento con N-succinimidil-bromo-acetato. Esto se logró mezclando CRM<sub>197</sub> (30 mg) en NaHPO<sub>4</sub> 0,1 M, EDTA 1 mM, azida de sodio al 0,02 %, pH 7,1 enfriado a 4 °C, con N-succinimidil-bromo-acetato (22 mg en 100 µl de DMF) a temperatura ambiente durante 2,0 horas. La mezcla de reacción se aplicó después a una columna Sephadex G-25 y se eluyó con NaHPO<sub>4</sub> 0,1 M, EDTA 5 mM, azida de sodio al 0,02 %, pH 6,0 y se almacenó a 4 °C hasta que se usó. Como se muestra en los dos espectros MALDI (figuras 45a y 45b) puede determinarse que aproximadamente 17 grupos amino en los residuos de lisina de CRM<sub>197</sub> se modificaron por este procedimiento.

#### **Etapas 6: Conjugación de CHO marcado en cistamina al transportador proteico activado.**

40 Con el fin de conjugar la molécula de carbohidrato marcada con cistamina al transportador proteico se añadieron ~ 15 mg de CRM<sub>197</sub> activado a ~ 18 mg de carbohidratos y se dejaron a temperatura ambiente durante 17 horas como se ilustra en la fig. 46.

La reacción se enfrió a 4 °C y después se añadió un exceso de cisteína (-50 mg) con el fin de capturar cualesquiera grupos de bromo-acetato libres que puedan quedar tras la reacción de conjugación.

45 La mezcla de reacción se purificó después en una columna de Sefarosa 6B eluyendo en PBS/citrato 10 mM. El material se concentró en una columna de centrifugación ultra-15 y se cuantificó para proteínas y carbohidratos dando una proporción de ~ 11 moléculas de CHO por proteína.

El conjugado se examinó por SDS-PAGE (fig. 47) y tinción de Coomassie, revelando un patrón de migración consistente con la proporción de carbohidratos a proteínas.

50 El conjugado se examinó también por prueba de bandas de western usando un anticuerpo monoclonal (mAb B5) específico de un epítipo de oligosacárido de núcleo interno. El conjugado se reconoció por este mAb indicando que el procedimiento de conjugación no había comprometido la conformación del núcleo interno y por lo tanto los epítopos de núcleo interno se presentaron apropiadamente en este glucoconjugado.

#### **Ejemplo 10: Inmunogenicidad de glucoconjugado.**

El glucoconjugado se usó inmunizando cuatro conejos (3 inyecciones de 50 de carbhidratos conjugados por inyección tres semanas aparte) y la respuesta inmune se sometió a seguimiento por ELISA de LPS para fuerza y grado de reactividad cruzada, según se ilustra en la figura 48, se observaron titulaciones buenas y reactividad cruzada excelente, con LPS que contiene un resto de PEtn en la posición 3 reconociéndose. Adicionalmente se reconocieron también glucoformas que se expanden a partir de Hep I. La especificidad de la respuesta inmune se indicó, ya que glucoformas expandidas con PEtn en la posición 6 (por ejemplo L2 y L4 de tipo silvestre) no se reconocieron. No se esperó que los sueros de control de un conejo que recibió CRM no conjugado y carbohidrato diesen una respuesta inmune reactiva de forma cruzada específica.

Los sueros se examinaron para actividad funcional en un ensayo bactericida e ilustraron matanza eficiente de la cepa homóloga y alguna matanza de la cepa de tipo silvestre cuando se compararon con los sueros pre-inmunes correspondientes (fig. 49).

#### **Ejemplo 11: Producción de mutantes desactivados específicos de Dd1 y Dd2 en *Dictyostelium*.**

Las estrategias de mutagénesis estándar se adoptan elaborando mutantes desactivados independientes de FAAHI y FAAHII. El mutante se usa en reacciones de N-deacilación específicas de LPS-OH de bacterias gram-negativas cuando crecen vegetativamente, lo que garantiza la retirada de ácido graso específico creando una molécula mono-acilada definida.

#### **Generación de mutantes desactivados de FAAHI.**

La casete del gen de resistencia a neomicina o la casete del gen de resistencia a blasticidina se introduce en el sitio Sspl de gen Dd1 clonado en el vector pCR2.1 (Invitrogen), el ADN recombinante obtenido se transforma en *Dictyostelium* generando células desactivadas por recombinación homóloga.

#### **Generación de mutantes desactivados de FAAHII.**

La casete del gen de resistencia a neomicina o la casete del gen de resistencia a blasticidina se introduce en el sitio EcoRV de gen Dd2 clonado en el vector pCR2.1 (Invitrogen), el ADN recombinante obtenido se transforma en *Dictyostelium* generando células desactivadas por recombinación homóloga.

#### **Referencias.**

Cox, A.D. y cols. Vaccine, 2005, 23, 5045-5054.

Verret, C.R. y cols. Rev. Infect. Dis., 1984, 6, 452-454.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparar una vacuna que comprende:
  - separar lipopolisacáridos de una bacteria de interés, en la que la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Neisseria meningitidis* y *Mannheimia haemolytica*;
  - 5 desesterificar el lipopolisacárido;
  - retirar al menos un ácido graso N-ligado del lipopolisacárido con una actividad amidasa aislada; y
  - conjuguar el lipopolisacárido modificado con una molécula transportadora adecuada.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la actividad de amidasa es a partir de un péptido que tiene al menos identidad del 70 % con la secuencia de aminoácidos según se expone bien en SEC ID N.º: 1 o bien en SEC ID N.º: 2 como se muestra en las figuras 5a y 5b, respectivamente.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la actividad de amidasa es a partir de un péptido que tiene al menos el 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos según se expone bien en la SEC ID N.º: 1 o bien en la SEC ID N.º: 2.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la actividad de amidasa es a partir de un péptido que tiene al menos identidad del 90 % con la secuencia de aminoácidos según se expone bien en la SEC ID N.º: 1 o bien en la SEC ID N.º: 2.
5. Un procedimiento de recuperar un lipopolisacárido modificado a partir de una bacteria de interés que comprende:
  - separar lipopolisacáridos de una bacteria de interés, en la que la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Neisseria meningitidis* y *Mannheimia haemolytica*;
  - 20 desesterificar la fase lipopolisacáridica;
  - retirar al menos un ácido graso N-ligado del lipopolisacárido con una actividad amidasa aislada; y
  - recuperar el LPS modificado.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la actividad de amidasa es a partir de un péptido que tiene al menos identidad del 70 % con la secuencia de aminoácidos según se expone bien en la SEC ID N.º: 1 o bien en la SEC ID N.º: 2.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la actividad de amidasa es a partir de un péptido que tiene al menos identidad del 80 % con la secuencia de aminoácidos según se expone bien en la SEC ID N.º: 1 o bien en la SEC ID N.º: 2.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la actividad de amidasa es a partir de un péptido que tiene al menos identidad del 90 % con la secuencia de aminoácidos según se expone bien en la SEC ID N.º: 1 o bien en la SEC ID N.º: 2.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el LPS modificado es soluble en agua, está O-deacilado y tiene al menos uno de los dos ácidos grasos N-ligados eliminado.
10. Una molécula de lipopolisacárido (LPS) mono-N-acilado-de-O-acilado aislada o purificada o una molécula de LPS de-N-acilado-de-O-acilado aislada o purificada a partir de una bacteria de interés conjugada a una proteína transportadora, en la que la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Neisseria meningitidis* y *Mannheimia haemolytica*.
11. Uso del conjugado de acuerdo con la reivindicación 10 en la elaboración de un medicamento para la inmunización de individuos que tienen, o que son sospechosos de tener, o que están en riesgo de desarrollar una infección por la bacteria de interés.

Fig. 1.

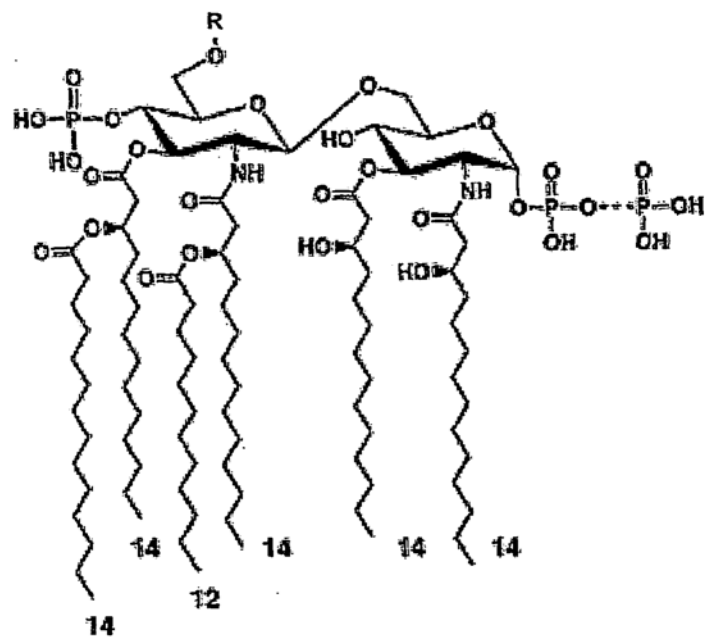


Fig. 2.

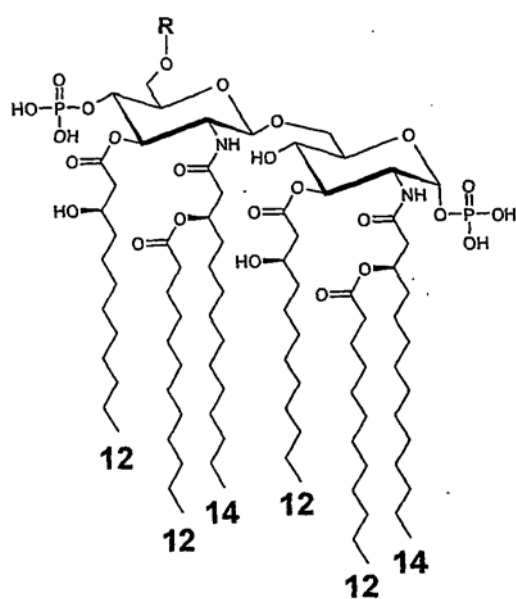


Fig. 3a.

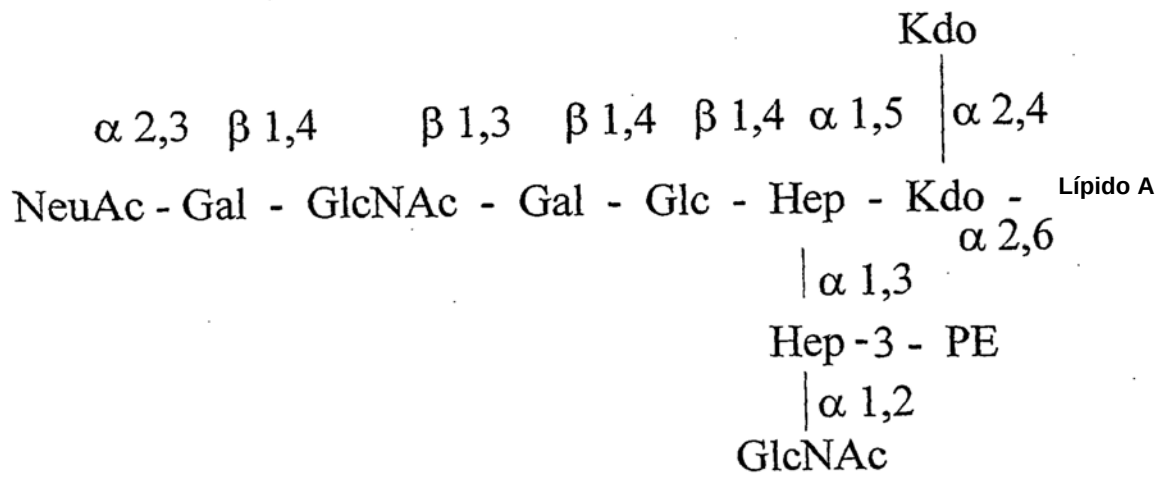


Fig. 3b

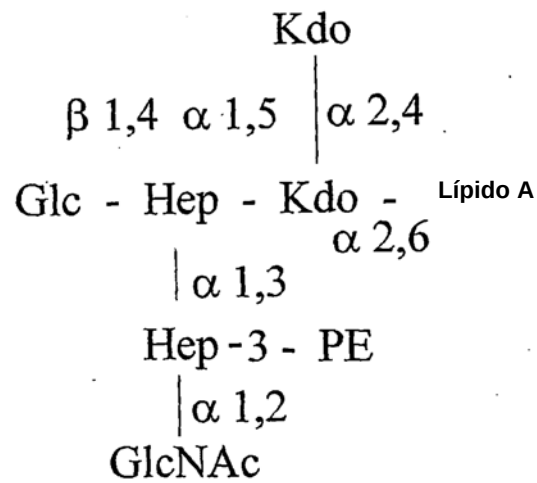


Fig. 3c.

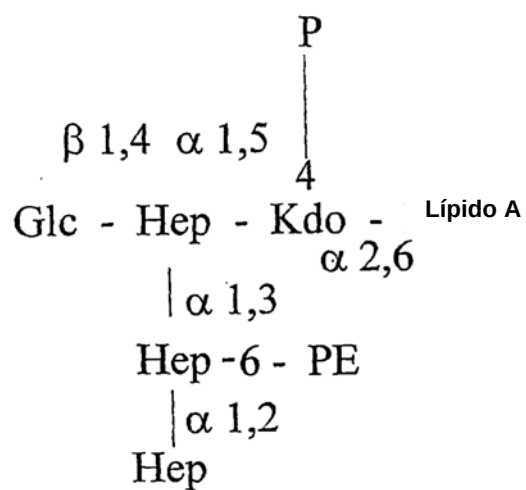


Fig. 3d.

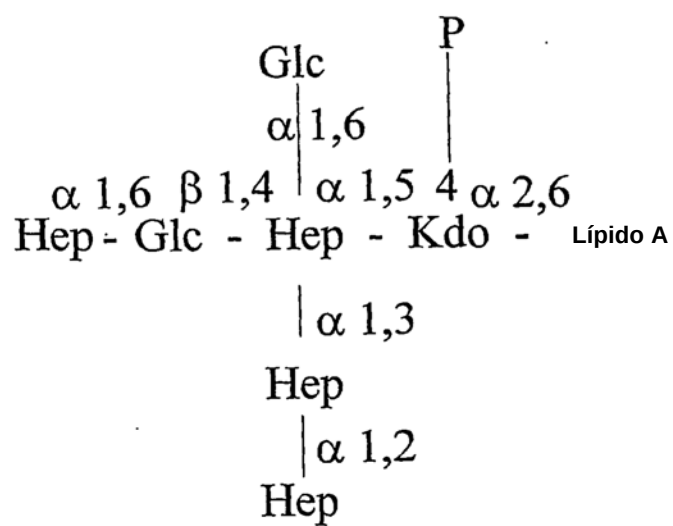


Fig. 4.

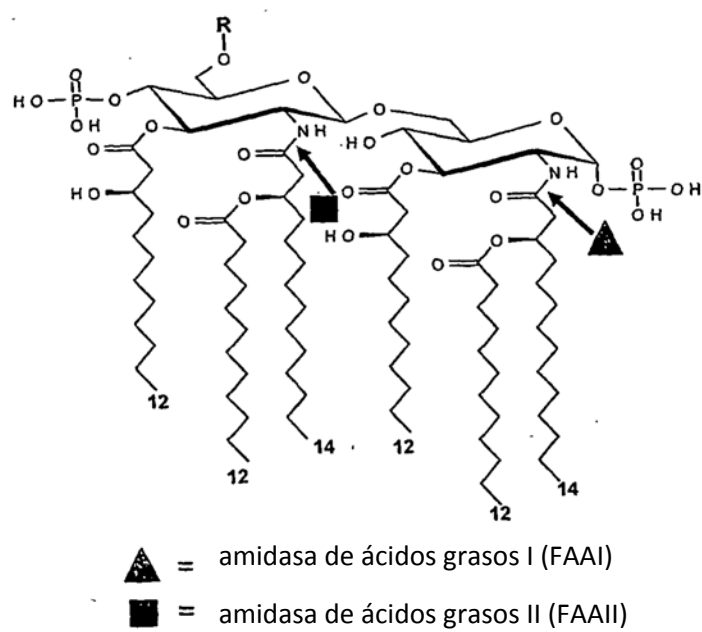


Fig. 5a. *Dd1* (550 aa con peso molecular 61,155 daltons en el cromosoma 4)

MNRLTNISKIRKSLIDGKLVNDLVLNKIKEINKVSPNHLNTFISLQDEKSLGKQIK  
 ESQERYDNGTNKRLDGIPIGVKDNFSSKNFKTTGSKILENYIPSFDSTVVKLLKE  
 EGAIIGKTNMDEFSGSSSTSGHFGKVINPWSKPNNNNNNNDNDNNNNNGEVLVY  
 AGGSSGGSAAAVASNYCVASIGSDTGGSIRQPSSYCGVVGFKPSYGLISRFGLVA  
 YASSLDTPGVLTNNVEDAAELLDILIKKDQENDSTSIEFINNNQNQNQNNGEKRNI  
 LDEFNEKLKNKNIKDLVFGIPKDYLVKELDTDILNLWKEVVVEIEKRGGKVVSVS  
 LPHTRYALPAYLLATSEASSNLSRFDGVRVYGYRFEEEEKDENKVDNDNDDDDD  
 VDENEKIGMGLKDMYTKTRTNGFGEEVKKRILGTMALSRSSYDNFYTKAQKIRR  
 LVSDDFKNVFQGENKVDILITPTAPSPAFAKQNEKMDPIEVYVNDIMTIPSNLAGLP  
 ACSIPLKLSNSNLPISVQLISNRLTDDNLLFAAHTIMNFDCYKDFTSLTPNYLK

Fig. 5b. *Dd2* (637 aa con peso molecular 70,282 daltons en el cromosoma 2)

MTSSSLSKSSSTSSTSSKNEEKGEKKIYDLISLEVPRLQGLLLRSTLFLCENHYLKN  
 SFLSSLYTKNKMPLISQFNLNLSPTFYPIVDISNHQQQQQNKSEFTFKKYLATDML  
 HDKDLIKYLQSKNLEINSQSSSSSSSNQSLINNIPENSIINYNYLYMTGKITPNEIA  
 NFFIECKNHSDEQSPPLKAFIKILEDIKSQAMASAERWKS GSPLSLIDGVPISLKD  
 EIDQIGYHTTCGTTFLEKVFPNVKTEDSGVAKMLRQQGAILVGKNNMHEIGISTL  
 GYNTHFGFTRNPYNLNHYPGGSSSGSASSVSAGLNPLSIGCDGGGSIRVPASLCG  
 VVGLKPTFARVSHGGIFDLCWSVGHVGPIGSSVIDTAIGYACIAGSDSADHQSVL  
 AEQYGGKPTVPMFTEIPLIQPLKGLKIGVFYDWINDCNIEFKDSTYKCIEILKEQG  
 AEIIEIEISNLLVTRLSQGAILSEMNSSMKRFKNYSNELQYDSRISLSIGNILPTSDY  
 LQANKVRTFCIEQFTEIFKGVDLIVTPTNAIAAPEIEKSVLSMGESNFGSVGELMK  
 YVFIGNITGIPGITVPVGLTKDKNLPIGFQIMAKWWQEDLLLYTSYVLEKNIDFKG  
 KPQYYNCPLTNCTNPNN

Fig. 6.

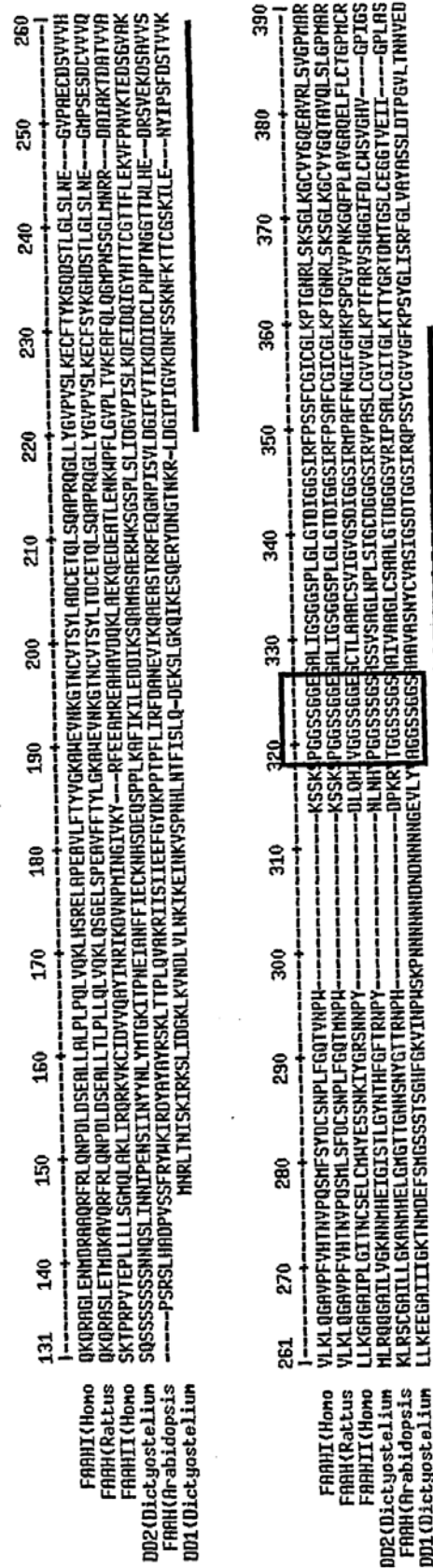


Fig. 7.

ATGTATAGATTCTAAATGTCAATTATATGGTATTGAACGTAGTGAATATATTACTTGTAT  
 CGATTATTATAAATTGTCCAGGTCCAAATACATGTGCTTCATTAGGTTTTGATAATGGAAA  
 TTACATTTCAAATGTGTGCCTTTAAAACCATTAAGTGAATGTAAACTCAATCAGA  
 ATGTTTCATTGGTGGTATATGTTCAAGTGAAAATAAATGTATTTCAAGATATTCAAAGAA  
 ACTAAATGAAATTTGTTATATAATAGTGAATGTGATTTTGGATTAAAAGTAAGTAAAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAATTAATTTAACAAATAATAACTCCTATTTTTTACCAATACAATAAGTGTGAAACTA  
 CAATTTATCATTATTTTCCAAATGGTACATTTAAAAATTTTGAAGAAATTAATAAATGTG  
 TACCATTGATCTATTCAAAAAACAATAATGTTTAGATGAAGSTGTCAAGAATATGAAT  
 TTTGTAATGGTGCAACAAATAAATGTTATCCTAAAAAGAAATACACAAATGATTGTAAAA  
 AAGCAGAAAAAGAAAGAGATTGCTGCTACATTTCAAATAACTGCTTCTTTTCAAATGAAC  
 AATATGATTTACTATCTCTGATTCTCCATTTTCAAATGAAATCTTGTCAAATGAAAC  
 ATTGTAAATGTCAAACAATCAATTATTTTAACCAATGTCAAATACATATACATTTTGTG  
 AATAAAACCTTTGATAATAAATATATATTAATAATTTTCAATTTTACCTTATTATAATTTT  
 TTTTTTTTTTTCAATCTCCCTTAATATCACTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAATCAAAAACTCGTTTAAACGACTTTTTTTTTAATTTTTATTTTTTTTATTTTTATT  
 TTTTATTTTTAATTAATAAATCATTGATGATTAACCAAGTGAATAGATTAAACAAATAT  
ATCAAAAATTAGAAAATCATTAAATAGATGAAAAATTAAAAGTGAATGATTAGTTTTAA  
TAAATCAAAGAGATTAAATAAGTTTCACCAATCATTAAATACATTTATTTCACTTCA  
 AGATGAGAAATCATTAGGGAAACAAATTAAGAGAGTCAAGAGAGATATGATAATGGTAC  
 AAATAAAGATTAGATGGTATACCAATTGGTGTAAAGATAATTTCTCAAGTAAAAATTT  
 TAAAACAACCTTGTGGTTCAAAGATTTTAGAGAATTATATACCAAGTTTGTGATTCACTGT  
 TGTTAAATTATTAAGAGGAGGTGCAATAATTATTGGTAAACTAATATGGATGAATT  
 TTCAATGGGTTTCATCTTCAACTTCTGGTCATTTTGGTAAAGTAATTAATCCATGGAGTAA  
 ACCAAATAATAATAAACAATGATAATGATAATAATAAATGGAGAGGTTTATATGT  
 TGCAGGTGGTTTCATCAGGTGGTTCCGCGAGCAGCAGTTGCTTCAAATTAATGTGTGTCATC  
 AATTGGATCAGATACAGGTGGTTCAATTAGACAACCATCATCATATTGTGGTGTGTGGT  
 TTTTAAACCATCCTATGGTTTAAATATCACGTTTTGGTTTAGTTGCATATGCTTCATCATT  
 AGATACACCTGGTGTTTTAACTAATAATGTTGAAGATGCTGCTGAATTTATAGATATTTT  
 AATTAATAAAGATCAAGAAATGATTCAACTTCAATTGAATTTATAAATAATAATCAAAA  
 TCAAAATCAAAATAATGGTGAAAAAGGAATATTTTAGATGAATTTAATGAAAAATTAAA  
 AAATAAAAAATATAAAGATTTAGTATTTGGTATACCAAAAGATTATTTAGTTAAAGAAAT  
 AGATACAGATATACTTAACCTTTGGAAAGAGTTGTTGAAGAAATTGAAAAAGAGGTGG  
 TAAAGTTGTATCAGTTAGTTTACCACATACTCGTTATGCATTACCAGCTTATTATTATT  
 AGCAACATCTGAAGCAAGTTCAAACCTTTCAAGATTGATGGTGTAGATATGGTATATAG  
 ATTTGAAGAAGAAAAAGATGAAAATAAAGTAGATAATGATAATGATGATGATGATGATGT  
 TGATGAAAATAAATTTGGTATGGGATTAAAAGATATGTATACAAAACCTAGAACAATGG  
 TTTTGGCGAAGAAGTTAAAAAAGAATTATACTTGGTACAATGGCATTATCAAGATCATC  
 ATATGATAATTTCTATACAAAAGCTCAAAAGATTAGAAGATTAGTATCAGATGATTTTAA  
 AAATGTTTTCCAAGGTGAAAATAAAGTAGATATTTTAATAACACCAACTGCACCATCTCC  
 AGCATTTAAACAAAATGAAAAATGGATCCAATCGAAGTTTATGTAAATGATATTATGAC  
 AATACCTTCAAATTTAGCAGGTTTACCAGCATGTTCAATTCCTTTAAACTTTCAAATTC  
 AAATTTACCAATTTAGTTCACTAATTTCAATCGTTTAACTGATGATAATTTTATTTATT  
 TGCAGCTCATACAATTATGAATTTTGAATTTTACAAAAGATTTTACATCACTTACACCAA  
TTATTTAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
ATCTTTTATATAATTTGTTTTATATTTTATCCACCATTTATATTTAAATAAATAAATAA  
 TTATTGTAATAATAATTATAACACCAATTATTGAACAACTATTAAATTTATTAATCAT  
 TTTTGTATAAATTTTGTATTGAAATGATTGTGAATAATTGAATGATTTTGAATTCGATG  
 ATGATAATAATGATGATTTACTACAACTGTAGTATCACTATCAGAATTACCACCTAATA  
 AAAATTGAAAATTTGGATCAATTATTGCTTTCTTTTAAATTTGGGAATATTAAATTGCAA  
 CTGTATTGATATTTCTTGAGAAATTTACTTTTAAACCAACGAATTTGGAATTTATTGAAT  
 TTGATAATAAATTTTTTTATCATCAATAAATACCTTTCTTTATAAATTCACCAACCATTG  
 AAATTTCAATTAACCTTAATACAATCCATGATAAATTTGTTTCAATTTAAATTTCTATATC  
 CAAATGAATTTGAAATACATGTCGTTTTATCATCGTCATTATATTTTAAATGTTGAATTAA  
 ATATAATTTGTAATGTATTTAATGGTGAGCTAAATTGATAATTTAAATTTCAATTGAAA

Fig. 7 continuación.

ATTTTAATGTATTTGGTTTAACTTATTGATTCACCAGCAAATCTAAAATTGTTGATA  
 AATTTGATTGATTTTGAGGGAATTTGAAATTATAATTTTAATTCACTATAACCATTTT  
 CAGTTGGGAATTTATTTGAATACATTATTGATGTTGCATTATATTGATTGAATGATGAAT  
 TTTCATAATTTTTTAAAACTTCCATGGTAATTTTGAAAAATCAAATCTTTAACAATTT  
 CATTTGAAAAACCACTTCACAACTTTAAAAAATGATATATCAGCATAACCACCTCCAC  
 AATTATTATTATTATTATTATTATCTGATTTAATCCATTGATAAGTTGATGGT

Fig. 8.

GTAGAGAACAAGAAACAAACAAACAAACAAATCCAAATAACTCTAAAAATTAAAAATT  
 TCAAAAATAATAATCATTATTTTATTGTGTATATATATAGAAAAAATAAAAAATTT  
 AAAAAAATAAAAATAAACTACCAACCTTTTTATTTTTTTTTTTTTTCCAAATTTTTT  
 TTTTTTTTCTTAAATTAATAAAACATTCTCTATTACTTAACATATTAATTAATCAATAT  
 TTTTAAAAAAGTTAAATGTTATTTTTATTAAATAGATTAAATTAATGAAGGAAAAA  
 AAAAAACCATAAAATAAAATAAAATGATAGATCTAAATAAAATAAACCTTTCAAAAA  
 ACTTTATTTTTGAAATTAATTAACACAAATTTCTTCCAAATAAATAACAATTTTATA  
 TTTTTTGACAACATTAATTAAGGAAATAAATAGTTTTTTTATTTTTATTATTTTTTT  
 TTTTTTAGGGCAAAGATTAATAATAATTTCCAATTTTTTCAAACCTCCCAATTTTTACC  
 ACCACACATTGCAACCAAAATTTTACATCTATAATTTTTATCGTCATTTTTTTATTATT  
 TTTTTTTTTTATTATTATTAATAATGTTTGGTTTTGAATTTAAACACATAAATCTTGATT  
 TATGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATTTTTTAAATTTAATTTATTTTTTATT  
 TTTTTTATTTTATTTTAAATTTTTTAAATTTTTTAAATTTTTTATTTTTTAAATTTT  
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATCTTCCCAAGTTTACTTGATGCATTTTAAATATT  
 TAATTAATTAGCCACACACAAAAATAATTCTTAAAAAACCCTTTTTTTTTTTTTT  
 TTTTTTTTTTTCTTCCATTTTAGGTTAAATAATTTATTATTATTTTTTTTTTAAATA  
 TTAAAACTTCTTTATTTTTTTTTCTCTATCAATAGGAAATGACATCTTCTTCAATAAG  
TAAGTAGTAGTACAAGTAGTACAAGTAGCAAGAATGAAGAAAAGGTGAAAAGAAAAT  
 TTATGATTTAATATCATTAGAAGTCCAAGATTACAAGGACTTTTATTAAGATCAACTTT  
 ATTTTTATGCGAAAACCATTTTAAAGTAAGTATTTTTATTTTTTATTATTTTTTTTTT  
 TTTTTTATATGTGTGGTTAGTTTTTTGATTTTTTAAATAATTATAAAAAATAAAAATA  
 AAAAAAAACCAATGTCTGTCACTTTCACACAGTCACACACTCAATTTATTTTCGATTA  
 ATTGTAATCTAATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATTTCTAATTTTATAAAAAAGGAAT  
 TCATTTTTATCGTCATTATATACAAAAATAAAATGCCATTAAATTTCACAATTTAATTTA  
 AATTTATCACCAACCTTTTATCCAATGTGTGATATTTCAAATCATCAACAACAACAACA  
 AATAAATCTGAATTTACATTTAAAAAATATTTAGCAACTGATATGTTGCATGATAAAGAT  
 TTAATTAATATCTTCAAAGTAAAAATTTAGAAATAAATAGTCAATCATCATCATCATCA  
 TCATCAATAATCAATCATTAAATTAATAATATACCAGAGAATTCATTATAAATTATTAT  
 AATTTATATATGACTGGAAAGATAACACCAAAATGAAATTGCAAATTTTTTTATTGAATGT  
 AAAAATCACTCTGATGAACAATCACCACCATTGAAAGCATTATATAAAGATATTGGAGGAT  
 GATATTAAATCTCAAGCAATGGCAAGTGCTGAACGTTGGAAATCCGGTTCACCTTTGTCA  
 TTGATTGATGGTGTACCAATCTCATTAAAAAGATGAAATAGACCAAAATTGGATATCATACC  
 ACTTGTGGTACAACCTTTTTTGGAGAAAGTATTTCCAAATGTTAAACTGAAGATTCTGGT  
 GTAGCCAAAATGTTACGTCAACAAGGTGCAATTTTAGTTGGAAAGAATAATATGCACGAA  
 ATTGGTATCTCAACACTTGGTTATAATACTCATTTTGGGTTCACTAGAAATCCATATAAT  
 CTCAATCATTATCCAGGTGGTAGTTCTTCAGGAAGTGCTTCTTCAGTATCGGCTGGTTTA  
 AATCCATTAAAGTATTGGTTGTGATGGTGGTGGTTCAATTAGAGTACCTGCTTCATTATGT  
 GGTGTCGTTGGTTTAAACCAACTTTTGCAAGAGTTTCTCATGGTGGTATTTTTGATTTA  
 TGTGGTCAAGTTGGTCAATGTTGGTCCAATTTGGTTCGTCAAGTAAATGATACTGCAATGGT  
 TATGCTTGTATTGCTGGTCTGACTCTGCCGATCATCAATCTGTTTTAGCTGAACAATAT  
 GCGGGTAAACCAACCGTTCCAATGTTTACTGAAATTCATTAAATCAACCATTAAGGCT  
 TTAAAAATTGGTGTTTTTTTATGATTGGATTAAATGATTGTAATATAGAATTTAAAGATTCA

Fig. 8 continuación.

ACTTATAGTAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAATTAAAAATTAATAATAATATTAA  
 TAATTCATTACTTTGATTAAATTATTAGAAATGTATTGAAATTTTAAAAGAACAAGGAGCTG  
 AAATTATAGAAATAGAAATTTCAAATTTATTAGTAACTAGATTATCACAAGGCGCAATTA  
 TTTTATCAGAAATGAATTCATCTATGAAAAGAGTAATTATTTAATTTATTTAATTATTTT  
 TTATTAATTTAATTAATTTTATTAATATAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACATTTA  
 AAAAAATAGTTTAAAAATTATAGTAATGAATTACAATATGATAGTAGAATTTTCATTATCA  
 ATTGGTAATATATTACCAACTTCAGATTATCTTCAAGCAAATAAAGTTAGAACTTTTGT  
 ATTGAACAATTTACTGAAATTTTAAAGGAGTTGATTTAATTGTAACACCAACTAATGCA  
 ATAGCTGCACCTGAAATTGAAAAAGTGTGTTGCTATGGGAGAATCAAATTTGGATCA  
 GTAGGTGAATTAATGAATATGTTTTATTGGAAATATTACTGGTATCCCTGGCATAACT  
 GTTCCAGTGGGTCTAACAAAAGATAAAAACTTACCAATTGGTTTTCAAATTAATGGCAAAG  
 TGGTGGCAAGAAGATTTACTTTTATACACTTCTTATGTTTTAGAAAAAATATTGACTTT  
 AAAGGAAAAACCACAATATTATAATTGTCTTTAACAATTTGCACAAACCCAAATAACTAA  
 TATTTAAAAATAAAATAATTTATAAGATATATTTTTTTTATTGTTTATTATTTTTTTTTT  
 TAAAGGTGAGAATTTTAAATGTAAAGAAGTTATTCCTTTTAATTTTAATTTTCAAATAA  
 GGAATTTTAATTTAAAAATAAAGTGTGGCTTTTATTTTGTGTTATAAATAAATTAAAAA  
 ATAAATCAGTTCCACCAATTCAATTAATAAATTACAAAGGAGAACTATTTGTAAGTATT  
 GATTCTGGAATAATATACTTTTCAAGTTAATTTCTTAATCATTTGTTTTTTTTCAATTTT  
 ATTTTAGAAGACTAGGATTTTTTTTTTTTTTATAAATAAACTATTGTAGTATACAATTAGT  
 ATGTTATTTTTATTTATTTATTTTAGGTTTTTACTTTTGGAGAATTTAAAATGGTATGT  
 TATTTTAGATTAGGTAATTAATAATTAATTGGTGGTGAATTGTTGGAATTAGAGGACTA  
 GGAATCGAACCTTTTTTATATTTTTTTTTTATTTTTTTTACTAGGAATCGAACCTACGAT  
 TTTGCTTTTCTCCCATAAAAATTCACCCATTGTGGGTCTCGATCCCACGACCTGCAGCT  
 TAGAAGGCTGCCGAATTCCAACTTTGCTAAACGGGCTTTGATGAATTCCTTGTAATAAA  
 GCTTGTTAGCTTTATAAATATATAGGAGATCGAAAAAACAACAACAACAATCTC  
 TTTTTTGGATTATTTCAATTTTTCATATAAAAAAGACTTAAAAAACAAATAAATAAATAA  
 TAACTATCTTAAAAAGCCATCTTTTACTTTATTTGTAATTTATTATTTGTTTCGTTTTG  
 AGAATTTTGCCTAGCAAAATTTCAAAAAAGCAAAAAATAATCAGATCGAAAAAAC  
 AAACAACAACAATCTCTTTTTTGGATTATTTCAATTTTTCATATAAAAAAGACTTAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 9.

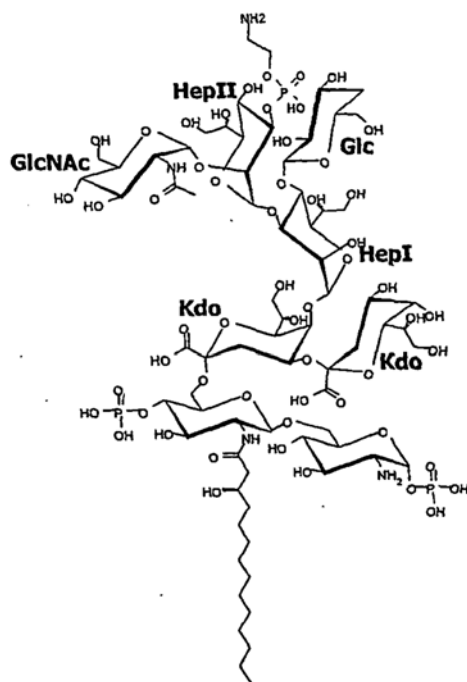


Fig. 10.

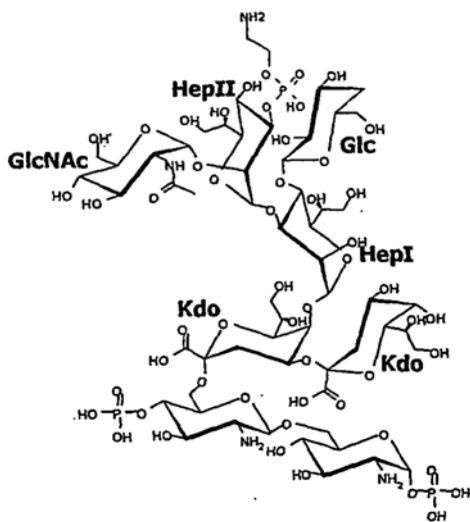


Fig. 11.

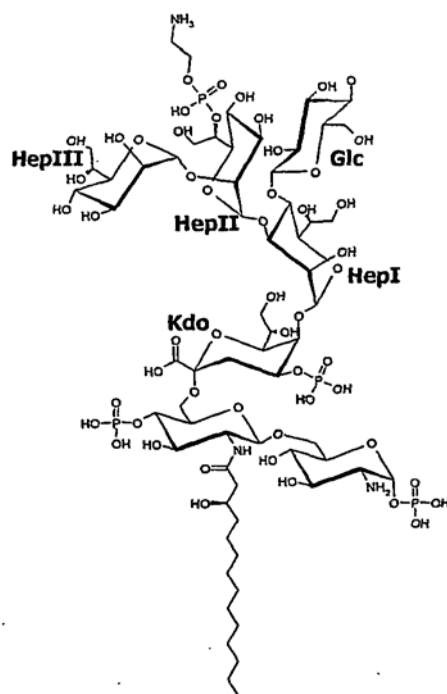


Fig. 12.

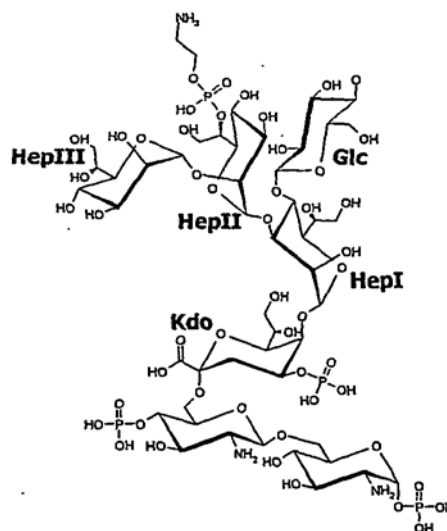


Fig. 13.

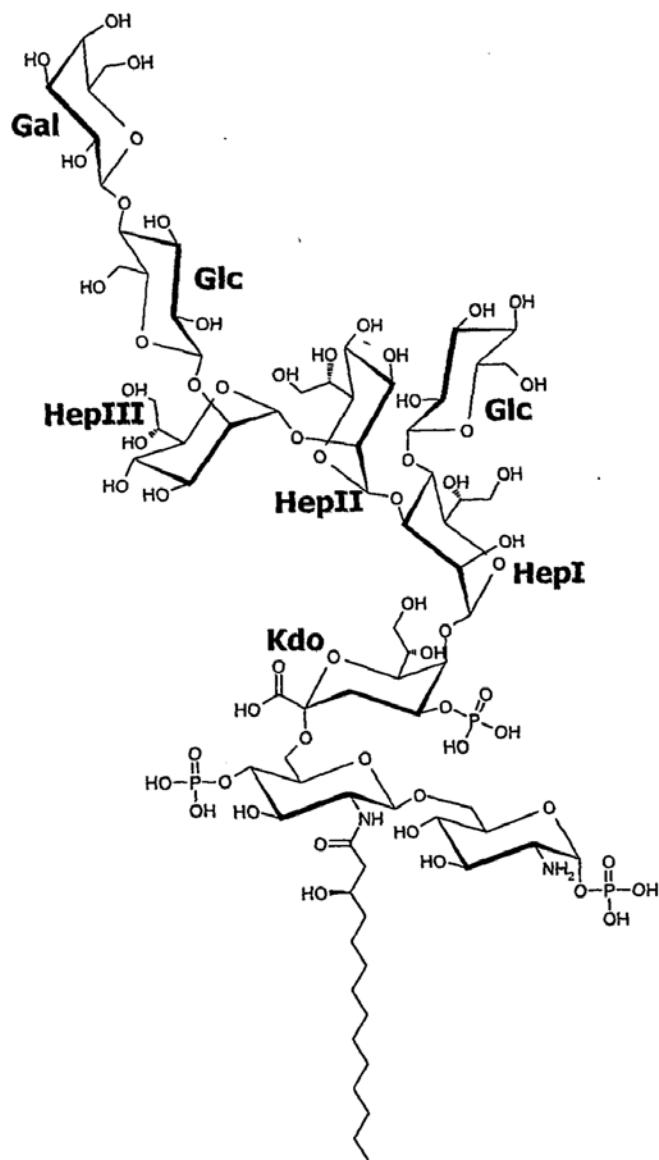


Fig. 14.

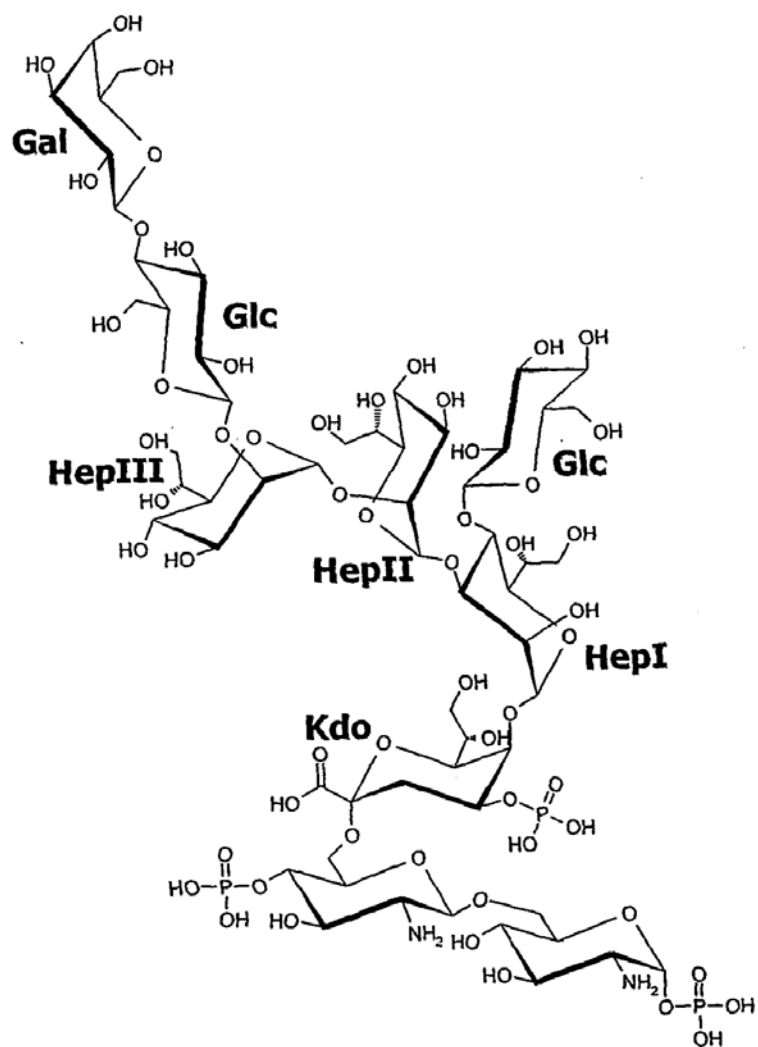


Fig. 15.

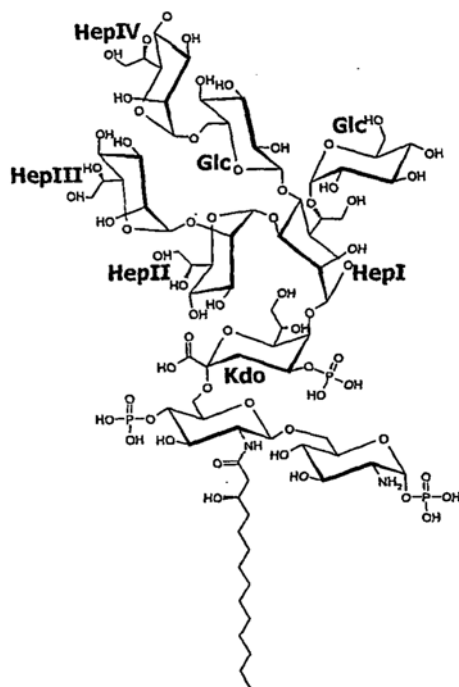


Fig. 16.

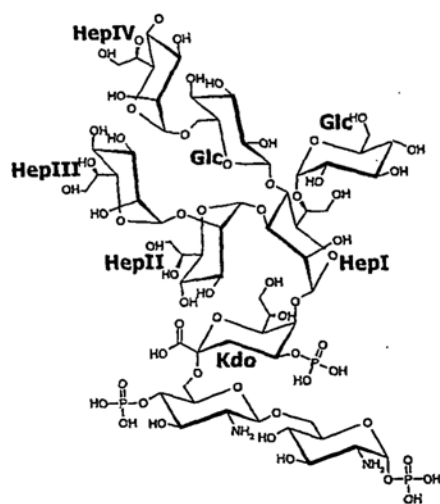


Fig. 17.



Fig. 18.

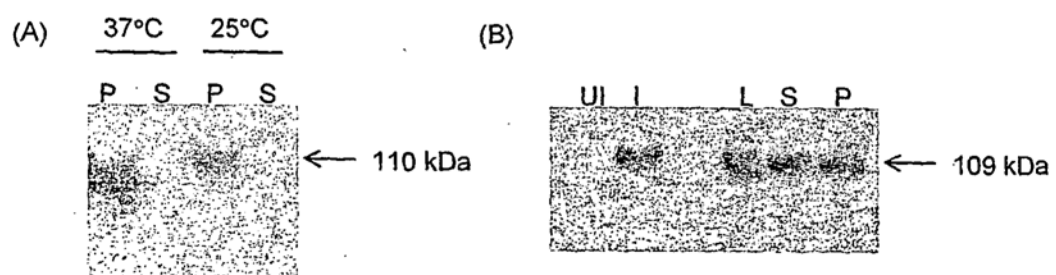


Fig. 19.

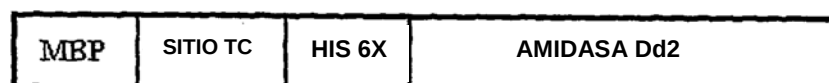


Fig. 20.

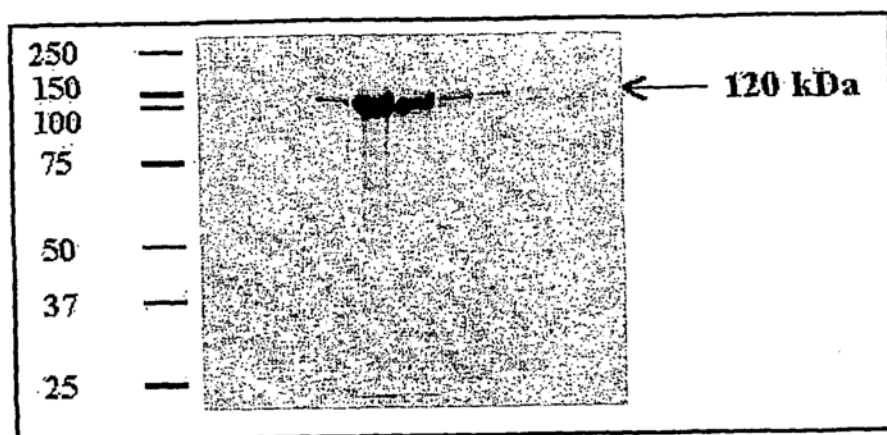


Fig. 21.

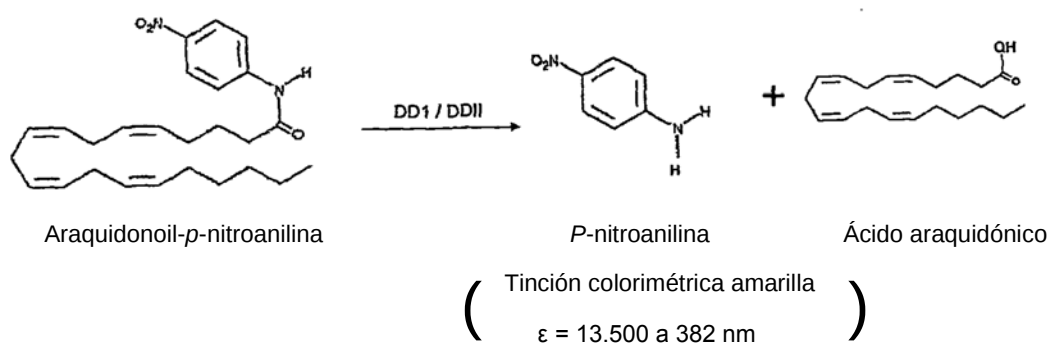


Fig. 22.

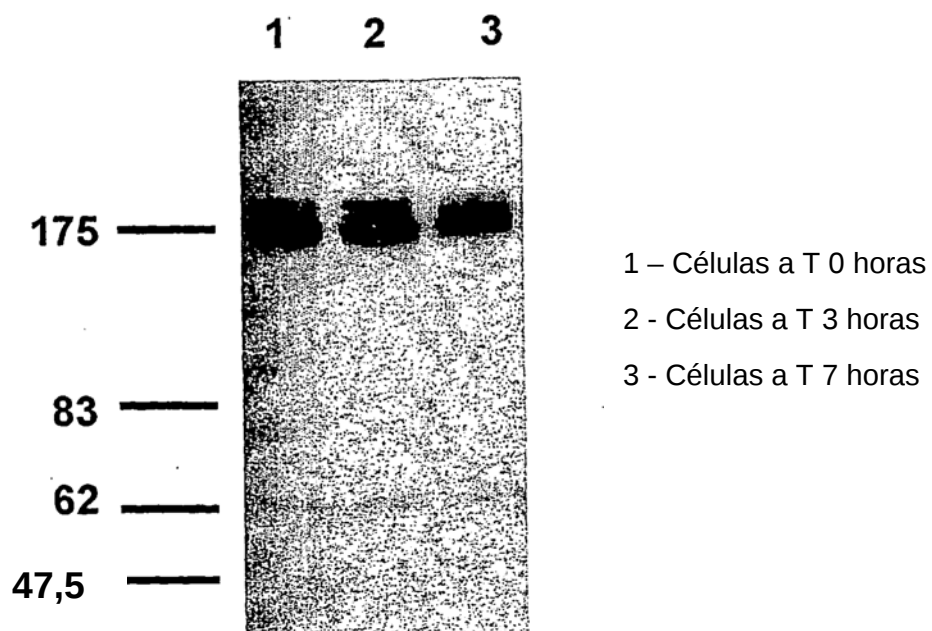


Fig. 23.

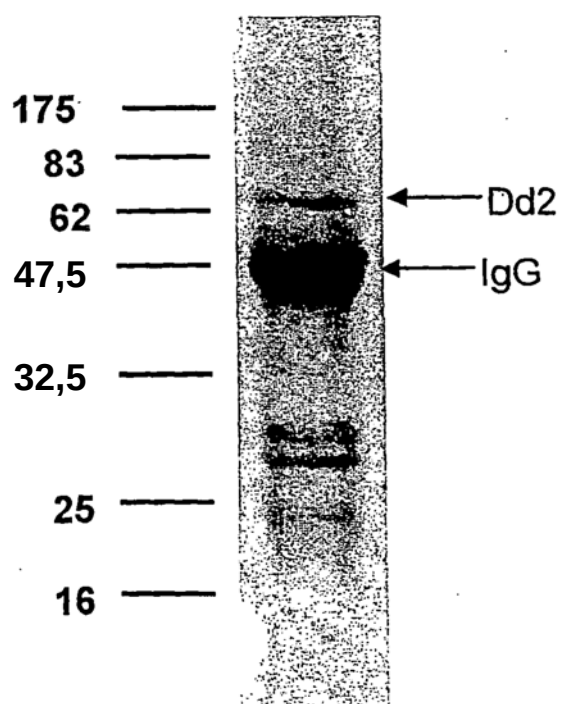


Fig. 24.

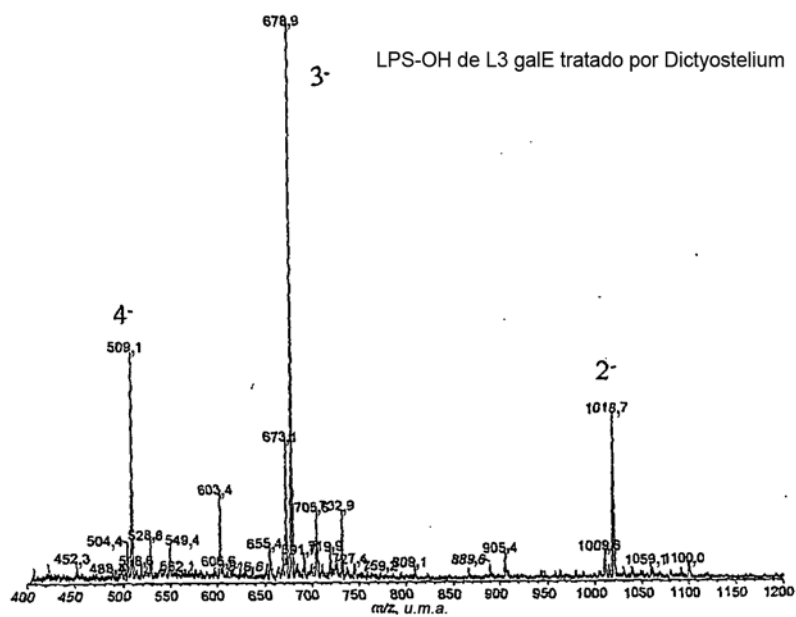


Fig. 25.

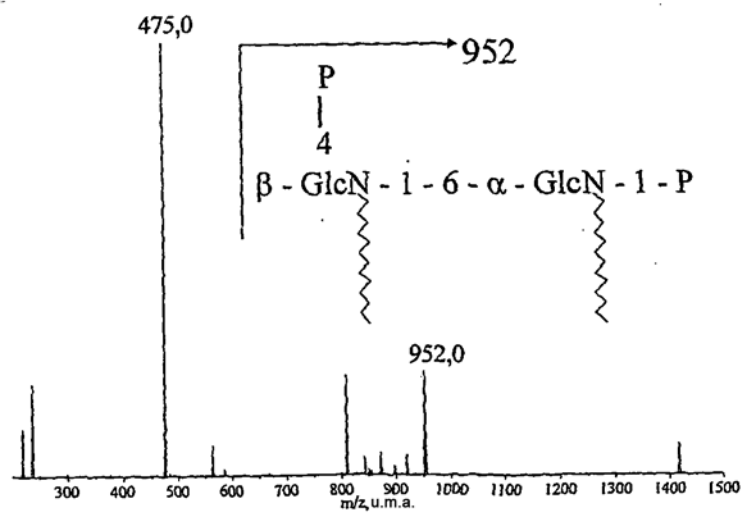


Fig. 26.

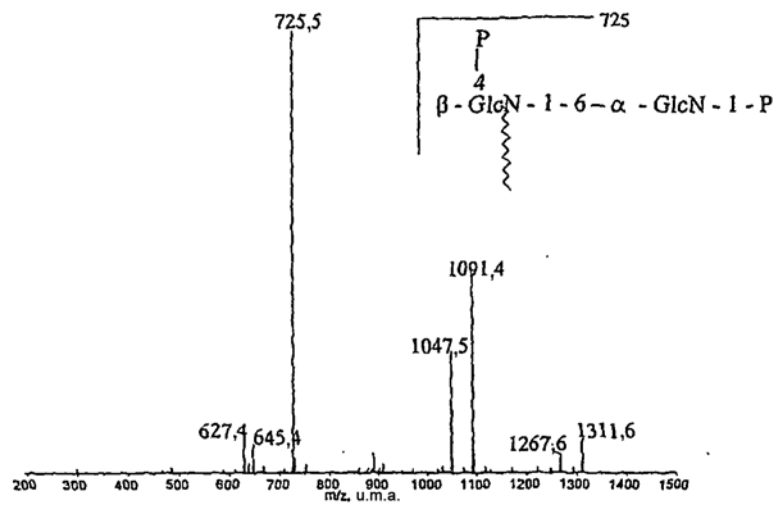


Fig. 27.

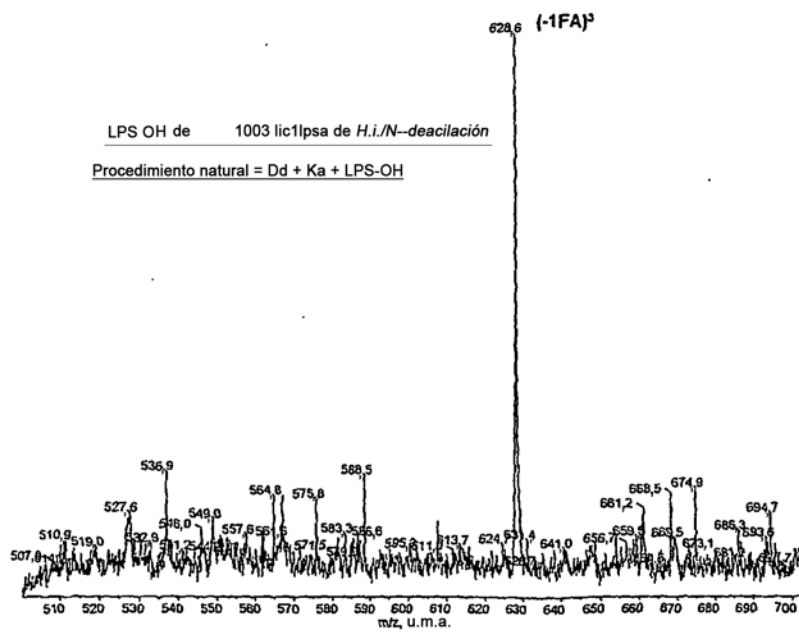


Fig. 28.

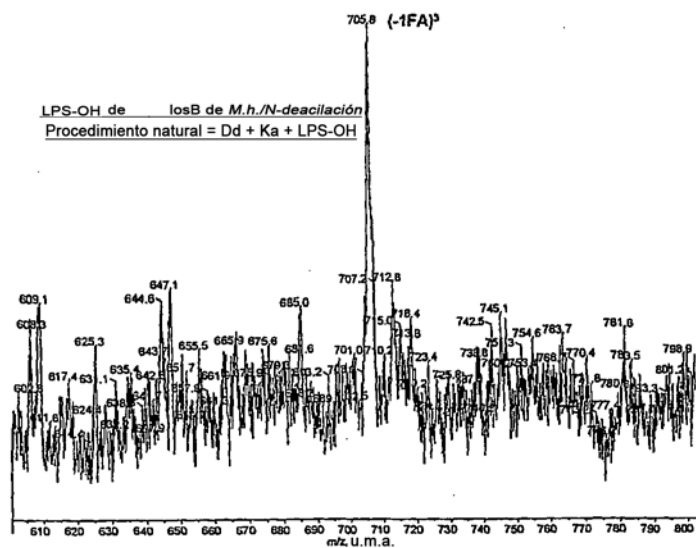


Fig. 29.

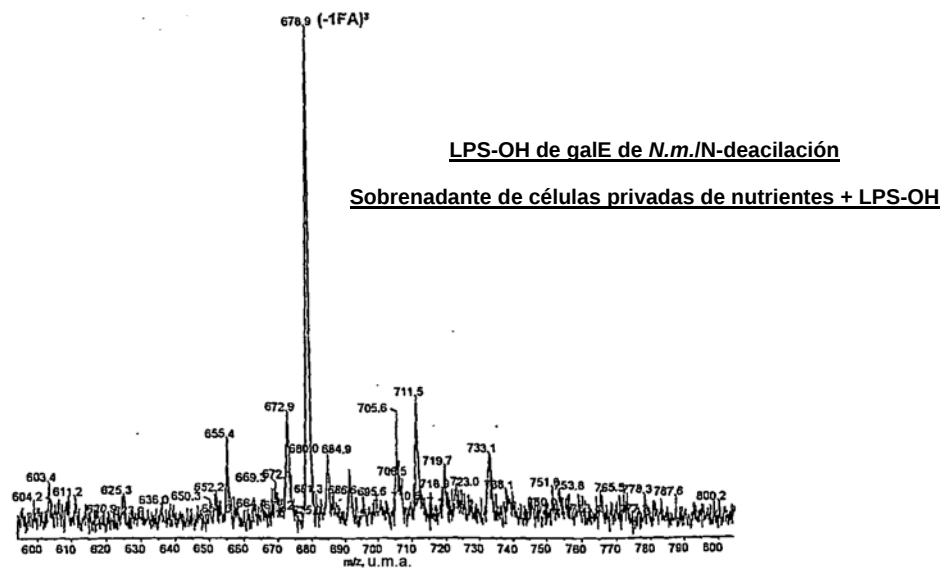


Fig. 30.

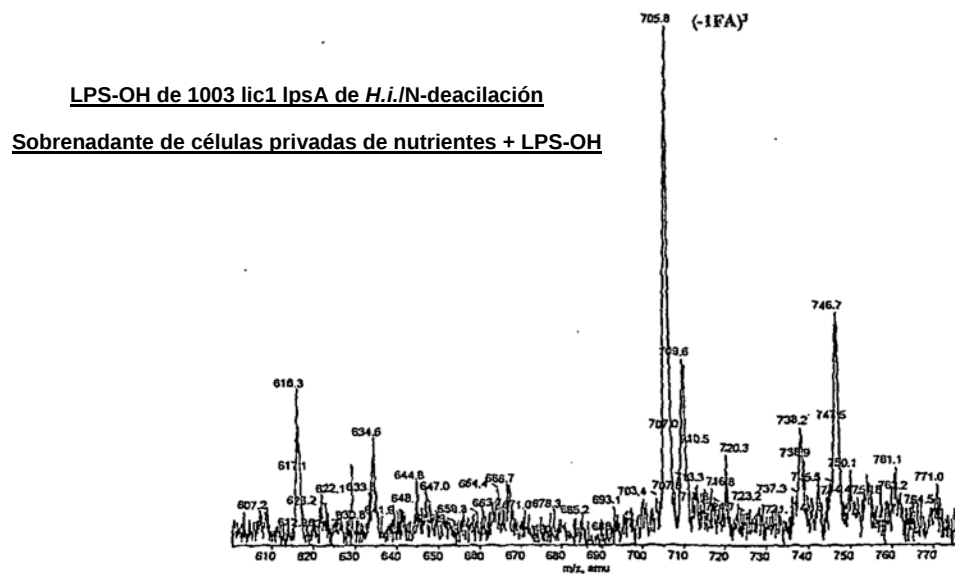


Fig. 31.

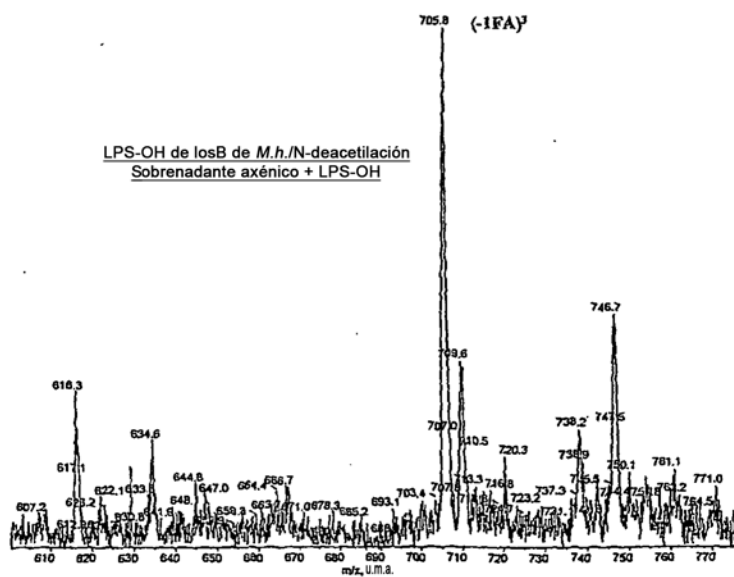


Fig. 32.

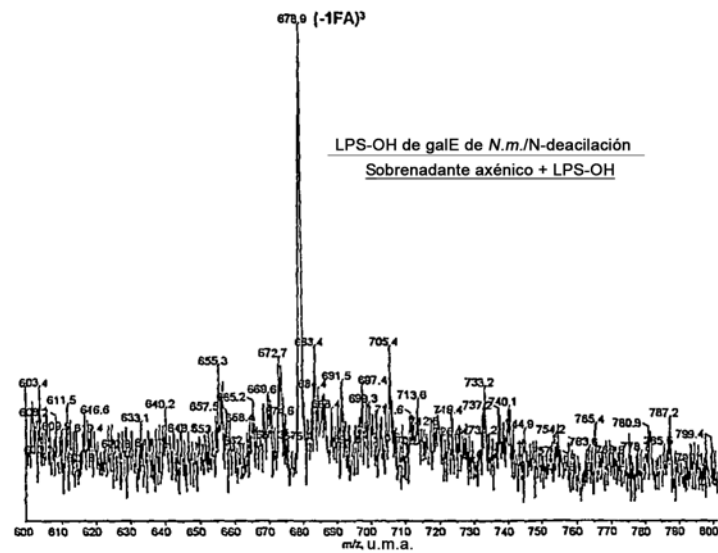


Fig. 33.

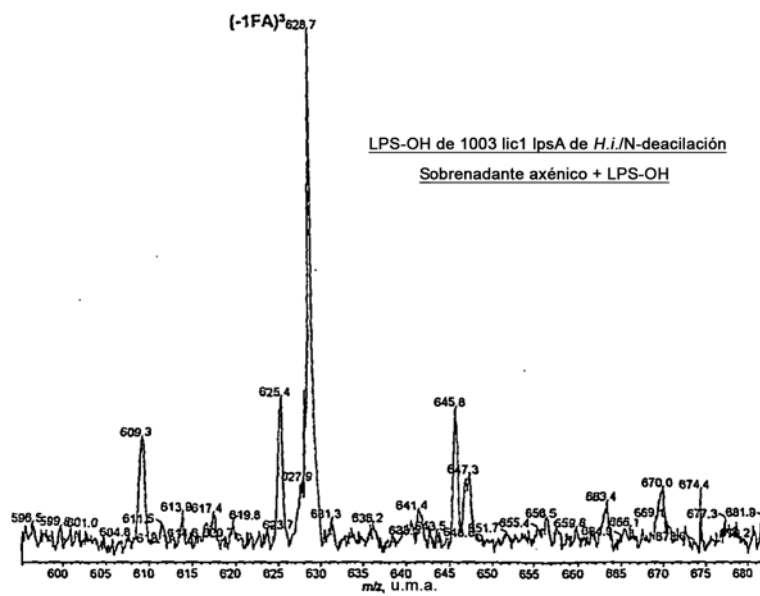


Fig. 34.

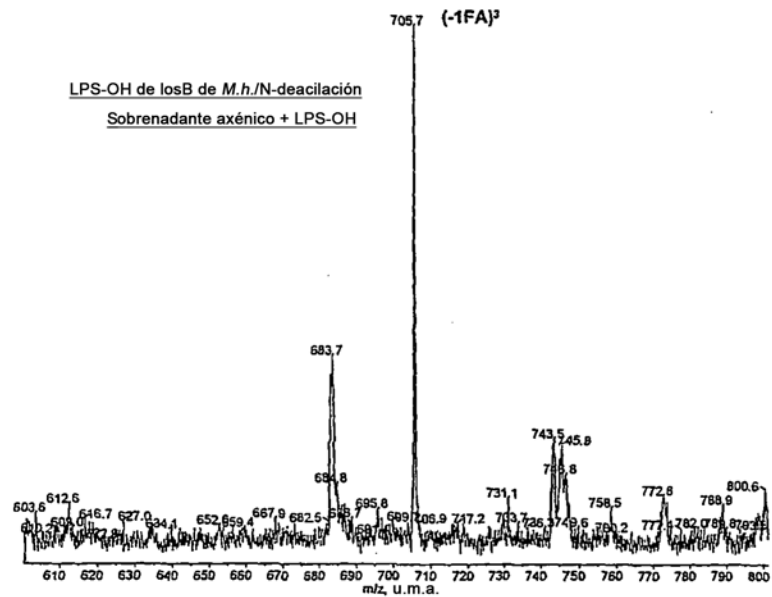


Fig. 35.

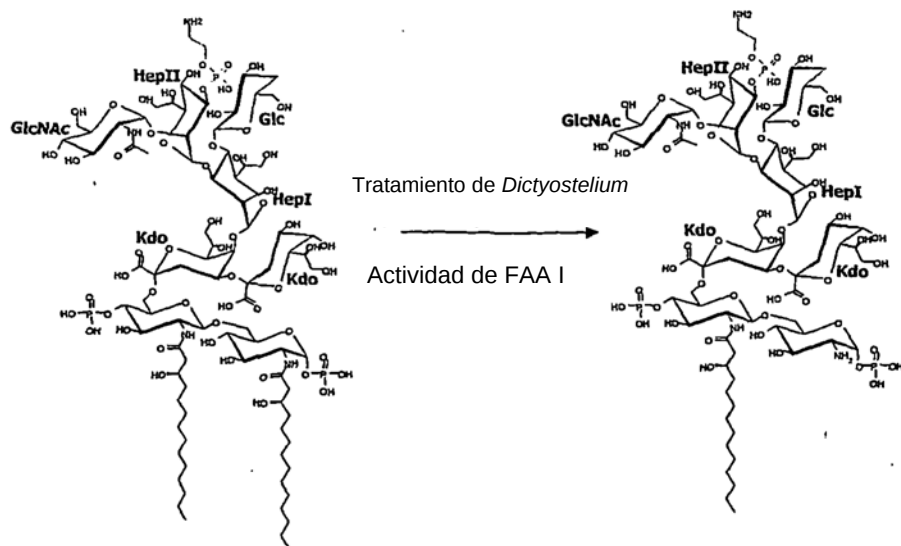


Fig. 36.

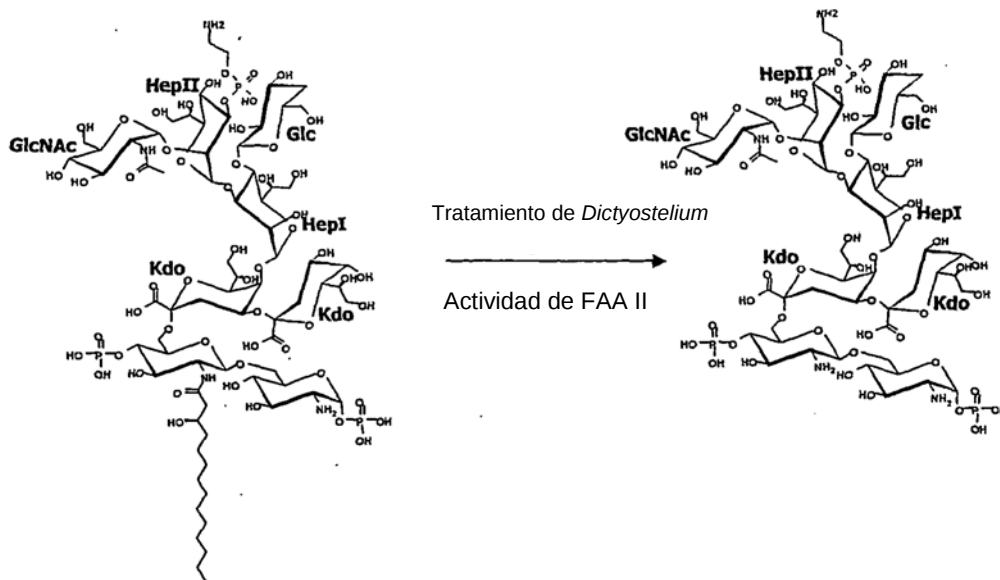


Fig. 37.

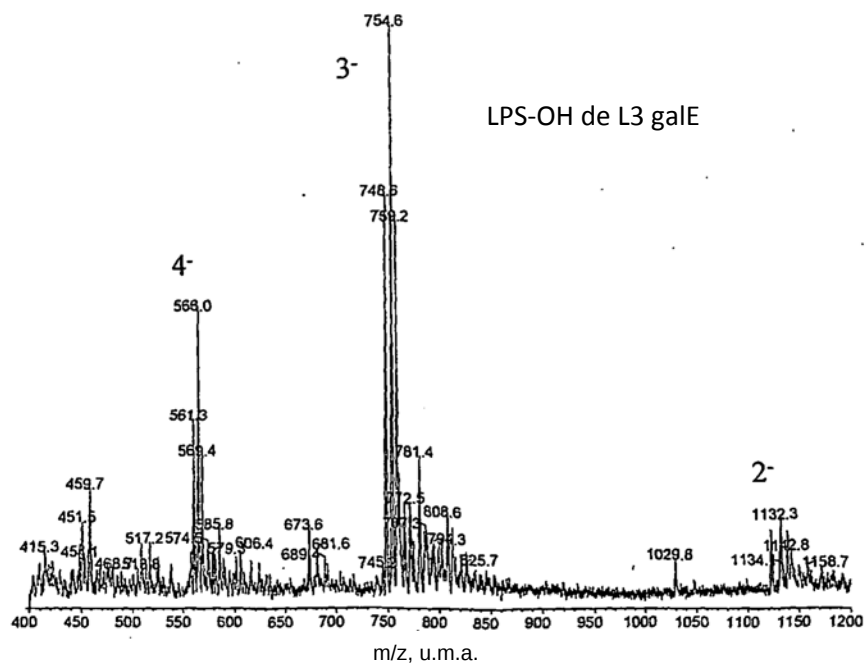


Fig. 38a.

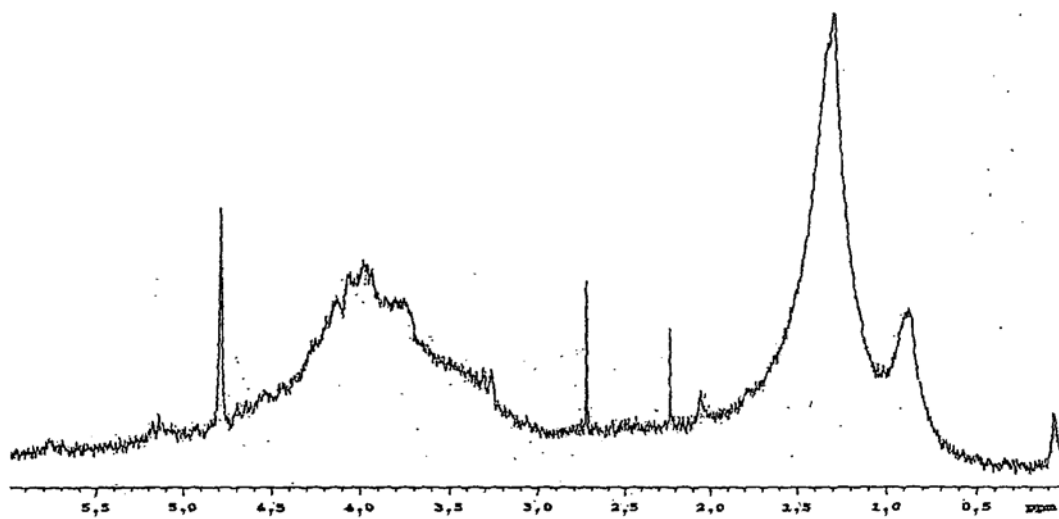


Fig. 38b

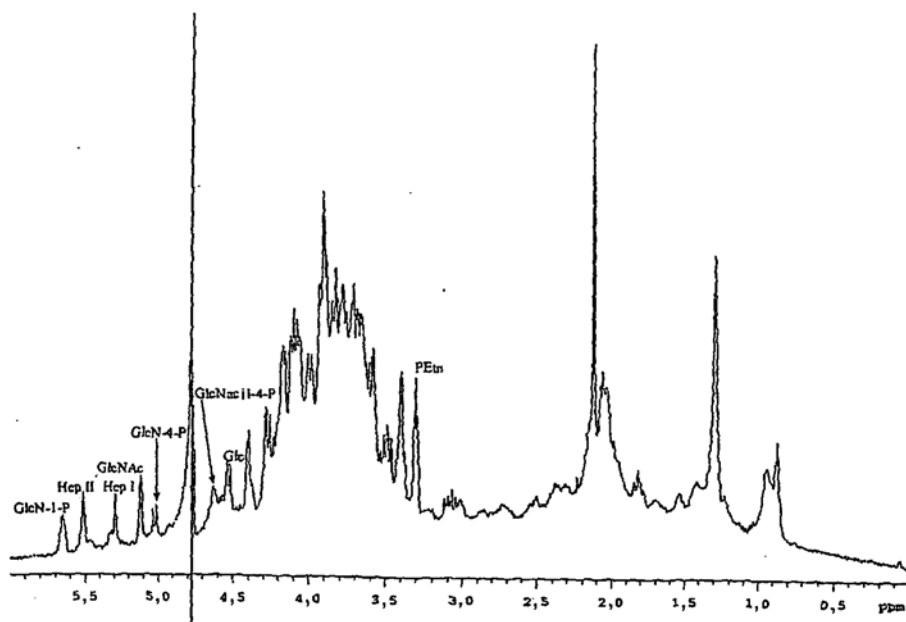


Fig. 39.

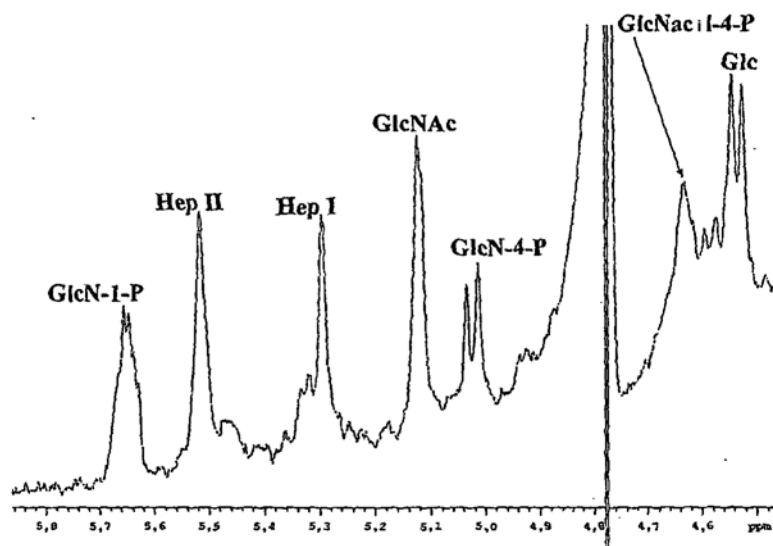


Fig. 40.

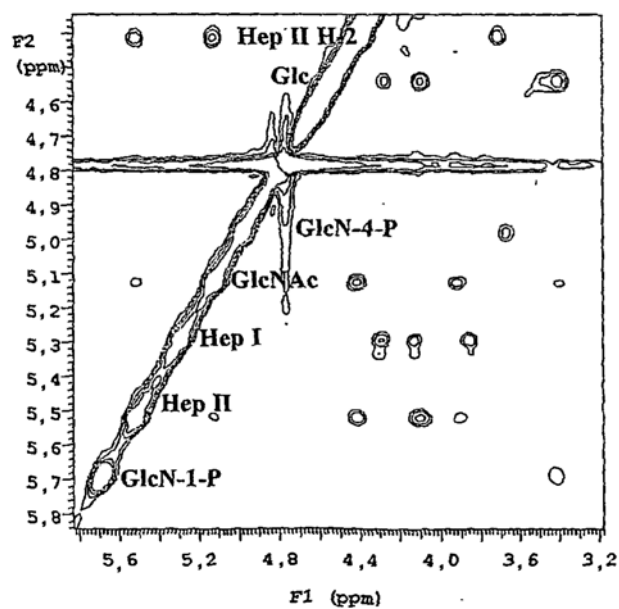


Fig. 41.

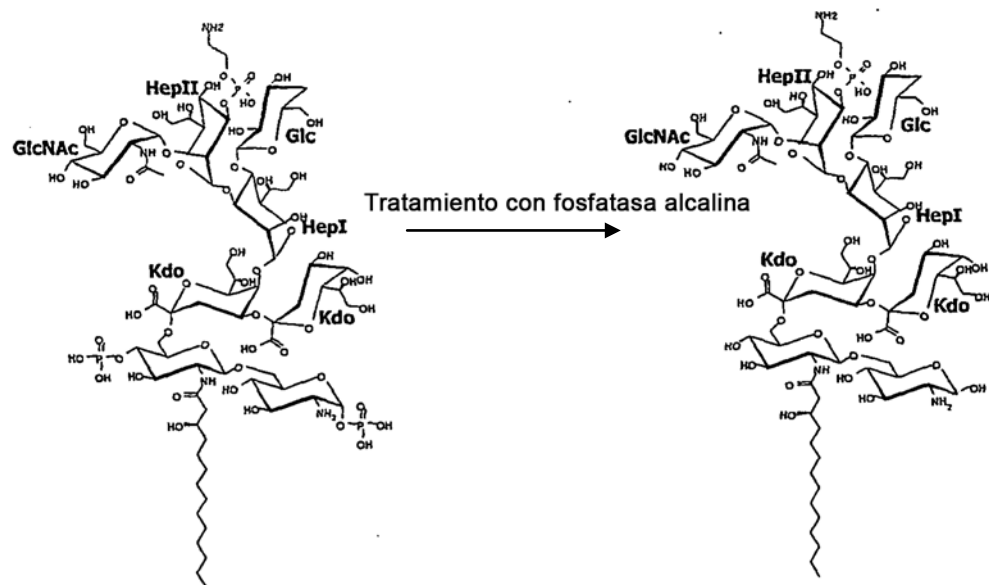


Fig. 42.

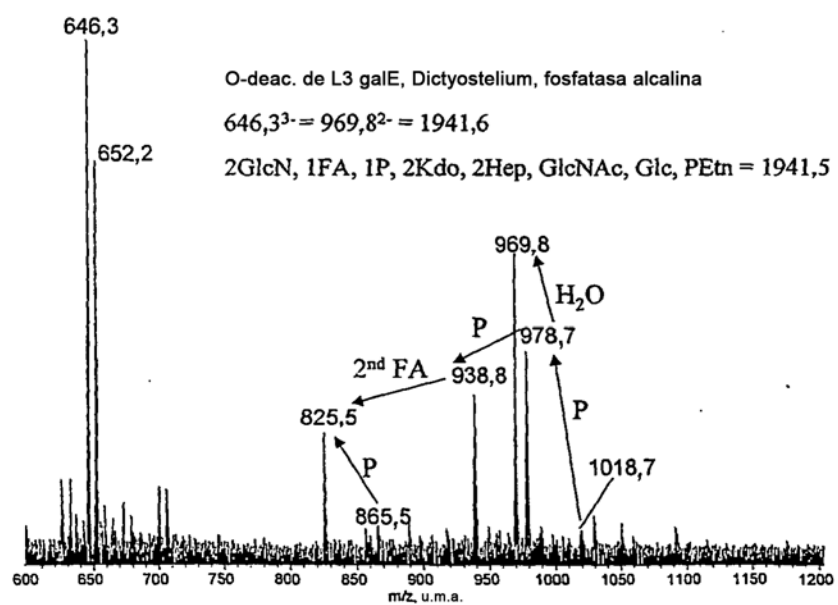


Fig. 43.

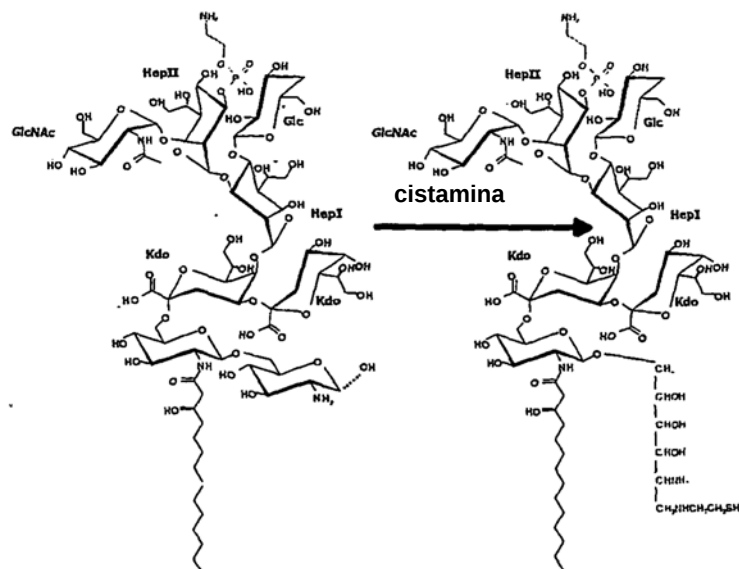


Fig. 44.

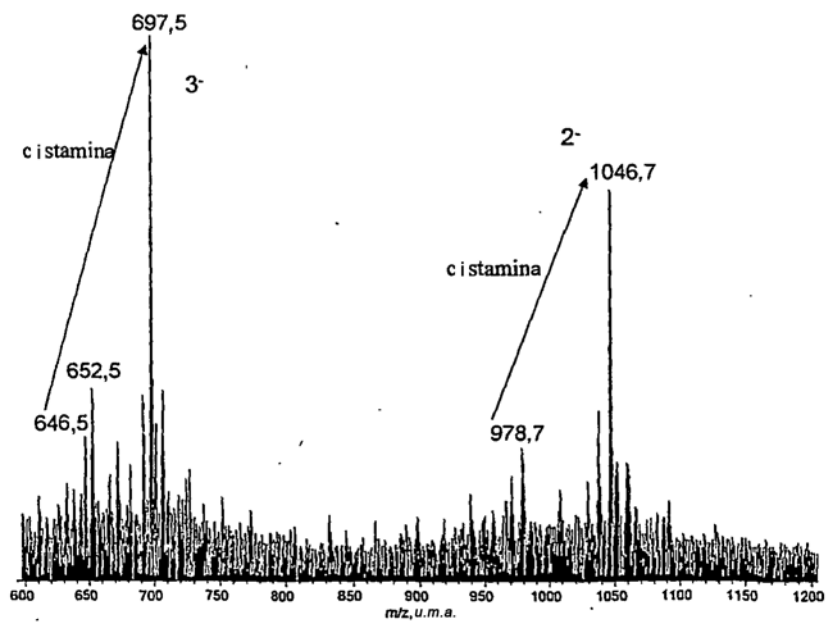


Fig. 45a.

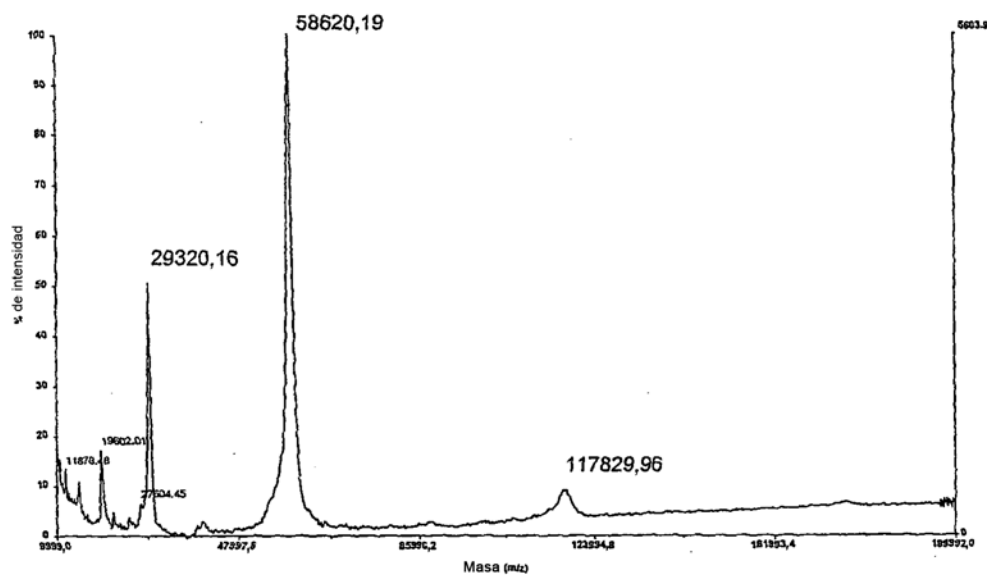


Fig. 45b.

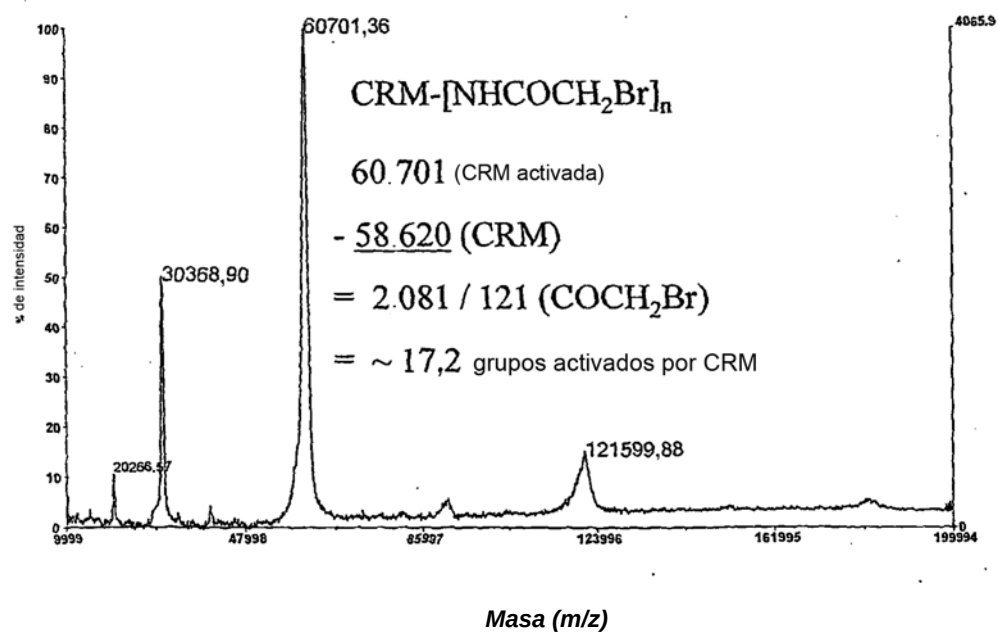


Fig. 46.

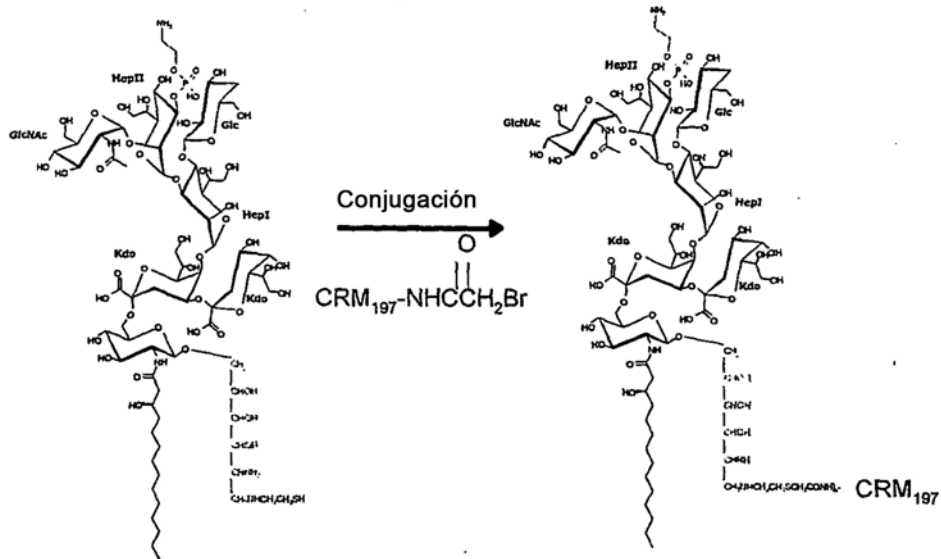
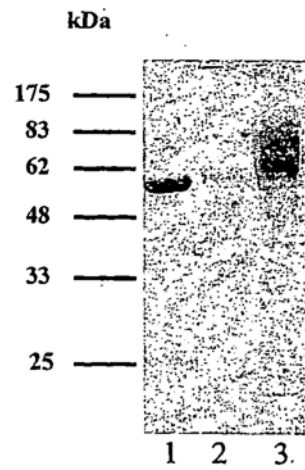


Fig. 47.



Carriles:

1: CRM

2: CRM activada

3: L3 galE-conj. purificado; *Dictyostelium*

Fig. 48.

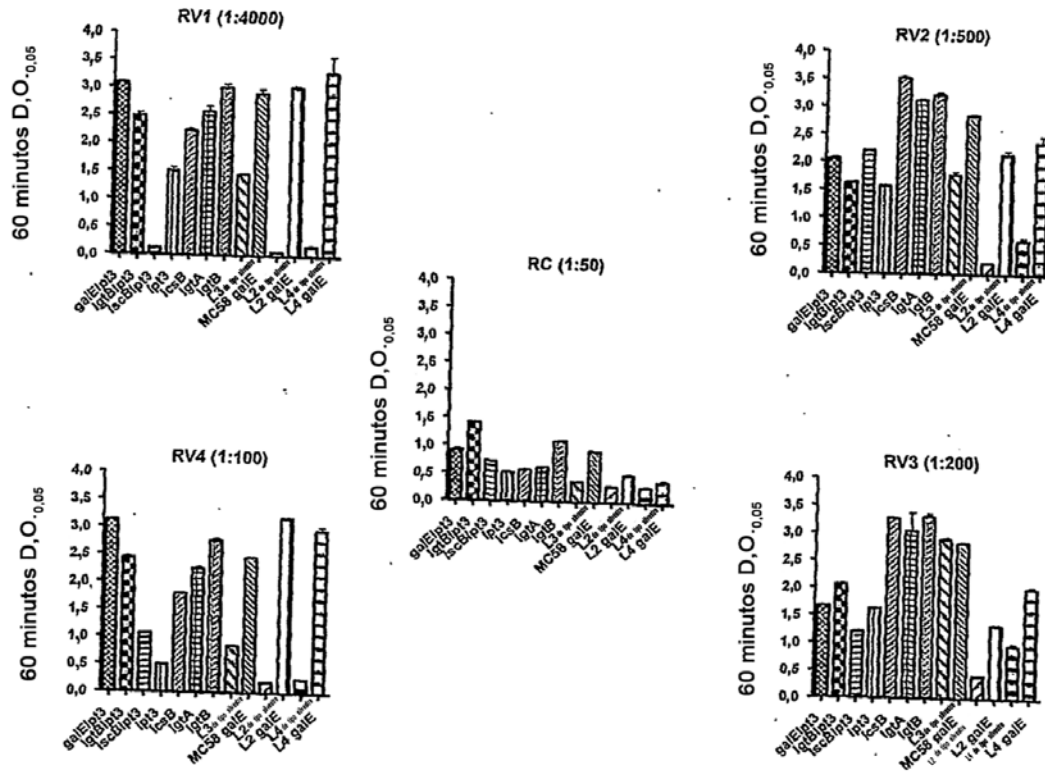


Fig. 49.

