

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 318**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/21** (2006.01)

**A61K 39/104** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2002 E 06022429 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1790659**

54 Título: **Polipéptidos de Pseudomonas aeruginosa**

30 Prioridad:

**13.11.2001 US 331221 P**

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

**26.11.2013**

73 Titular/es:

**ID BIOMEDICAL CORPORATION (100.0%)  
525 CARTIER BOULEVARD WEST  
LAVAL, QC H7V 3S8, CA**

72 Inventor/es:

**CHARLAND, NATHALIE;  
HAMEL, JOSEE;  
BRODEUR, BERNARD R.;  
MARTIN, DENIS;  
CHARLEBOIS, ISABELLE y  
BUSSIERE, DIANE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 431 318 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Polipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa*

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5 La presente invención se refiere a polipéptidos, más particularmente polipéptidos SPA-2 de *Pseudomonas aeruginosa* que pueden usarse para prevenir, diagnosticar y/o tratar una infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

10 La *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno bacteriano oportunista prevalente en seres humanos y animales. La *P. aeruginosa* es la bacteria gram negativa más común encontrada en infecciones nosocomiales, especialmente en individuos inmunodeprimidos. Se relaciona frecuentemente con neumonía asociada a ventilador en pacientes entubados. La infección por *Pseudomonas* es común entre pacientes con fibrosis quística, heridas por quemaduras, trasplantes de órganos y drogadicción por vía intravenosa. Los pacientes con fibrosis quística se infectan a menudo de forma crónica por *P. aeruginosa*, que es responsable del aumento de la enfermedad y de la muerte en esta población particular. La bacteremia por *P. aeruginosa* es responsable de altas tasas de muerte en unidades de quemados. Las *Pseudomonas* pueden causar afecciones graves tales como endoftalmítis, endocarditis, meningitis, 15 neumonía y septicemia. La septicemia provocada por *P. aeruginosa* está asociada con las tasas de muerte más altas de todas las infecciones gram negativas.

20 Debido a que la *P. aeruginosa* es resistente de forma natural a muchos antibióticos, existe la necesidad de desarrollar una vacuna que proteja individuos contra la infección por *P. aeruginosa*. Una infección por *P. aeruginosa* induce una respuesta inmunitaria contra antígenos encontrados en la superficie de las células bacterianas. No obstante, muchas de estas proteínas de superficie no están aún caracterizadas, ni se ha determinado la respuesta inmunitaria que tiene como consecuencia la protección contra la infección por diferentes cepas.

25 Para desarrollar una vacuna que proteja individuos de la infección por *P. aeruginosa*, se han concentrado los esfuerzos principalmente en lipopolisacáridos (LPS). No obstante, incluso aunque un número limitado de serotipos de LPS están asociados con casos clínicos, la producción de una vacuna basada en LPS polivalente es compleja y puede inducir el reemplazo de serotipos en individuos vacunados. También se evalúan vacunas antíflagelos y antipili, pero la regulación de la expresión de flagelos/pili en diferentes estados de infección por *P. aeruginosa* puede evitar la protección eficaz. También se están analizando proteínas de membranas exteriores (OMP). Existe actualmente una preparación de OMP de 4 serotipos diferentes de *P. aeruginosa* en ensayos clínicos, pero la especificidad de la protección conferida por esta preparación permanece sin evaluar. Una proteína de fusión 30 recombinante en base a las proteínas OprF y OprI de la membrana exterior se considera una vacuna experimental prometedora. No obstante, se ha demostrado que la proteína OprF estaba ausente en algunas cepas clínicas de *P. aeruginosa* y la protección conferida por la proteína OprI sola no se ha evaluado aún.

Una recapitulación de la tecnología existente se ha descrito por Stanislavsky ES y Lam JS. (1997) FEMS Microbiol. Rev. 21 (3): 243-77 y Holder IA. (2001) J. Burn Care Rehabil. 22(5): 311-20.

35 La secuencia del genoma de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 se determinó en una colaboración entre la Cystic Fibrosis Foundation (Fundación de fibrosis quística), la Universidad de Washington y la Pathogenesis Corporation (Corporación de patogénesis) y está disponible en <http://www.pseudomonas.com/>, [http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=n\\_tpa03](http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=n_tpa03), <http://pseudomonas.bit.uq.edu.au/> y en Nature, Stover y col. 406:959-964 (2000).

40 Los documentos WO 99/57142, EP0717106, EP0297291 y WO 01/40473 divulgan polipéptidos de *P. aeruginosa*.

Por lo tanto, existe aún la necesidad no satisfecha de polipéptidos de *P. aeruginosa* que se puedan usar para prevenir, diagnosticar y/o tratar una infección por *P. aeruginosa*.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

Según un aspecto, la presente invención se refiere a la reivindicación 1

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

45 La figura 1 representa la secuencia de ADN del gen SPA-1 de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1; SEC ID N°: 1. La porción subrayada de la secuencia representa la región codificante del péptido líder.

La figura 2 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido SPA-1 de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1; SEC ID N°: 2. La secuencia subrayada representa el péptido líder de 32 restos de aminoácidos.

50 La figura 3 representa la secuencia de ADN del gen SPA-2 de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1; SEC ID N°: 3. La porción subrayada de la secuencia representa la región codificante del péptido líder.

La figura 4 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido SPA-2 de la cepa de P. aeruginosa PAO1; SEC ID N°: 4. La secuencia subrayada representa el péptido líder de 19 restos de aminoácidos.

La figura 5 representa la secuencia de ADN del gen SPA-3 de la cepa de P. aeruginosa PAO1; SEC ID N°: 5. La porción subrayada de la secuencia representa la región codificante del péptido líder.

- 5 La figura 6 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido SPA-3 de la cepa de P. aeruginosa PAO1; SEC ID N°: 6. La secuencia subrayada representa el péptido líder de 21 restos de aminoácidos.

La figura 7 representa la secuencia de ADN del gen SHB-PA104 de la cepa de P. aeruginosa PAO1; SEC ID N°: 19. La porción subrayada de la secuencia representa la región codificante del péptido líder.

- 10 La figura 8 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína SHB-PA104 de la cepa de P. aeruginosa PAO1. SEC ID N°: 20. La secuencia subrayada representa el péptido líder de 16 restos de aminoácidos.

La figura 9 representa la secuencia de ADN del gen SHB-PA105 de la cepa de P. aeruginosa PAO1; SEC ID N°: 21. La porción subrayada de la secuencia representa la región codificante del péptido líder.

La figura 10 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína SHB-PA105 de la cepa de P. aeruginosa PAO1; SEC ID N°: 22. La secuencia subrayada representa el péptido líder de 33 restos de aminoácidos.

- 15 La figura 11 representa la secuencia de ADN del gen SHB-PA106 de la cepa de P. aeruginosa PAO1; SEC ID N°: 23. La porción subrayada de la secuencia representa la región codificante del péptido líder.

La figura 12 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína SHB-PA106 de la cepa de P. aeruginosa PAO1; SEC ID N°: 24. La secuencia subrayada representa el péptido líder de 16 restos de aminoácidos.

- 20 La figura 13 representa el alineamiento de secuencia de proteína de la proteína SPA-1 con SHB-PA104 (sin péptidos líder) de la cepa PAO1. |, aminoácidos idénticos; :, aminoácidos conservados.

La figura 14 representa el alineamiento de secuencia de proteína de la proteína SPA-1 con SHB-PA105 (sin péptidos líder) de la cepa PAO1. |, aminoácidos idénticos; :, aminoácidos conservados.

La figura 15 representa el alineamiento de secuencia de proteína de la proteína SPA-1 con SHB-PA106 (sin péptidos líder) de la cepa PAO1. |, aminoácidos idénticos; :, aminoácidos conservados.

## 25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona polinucleótidos purificados y aislados que codifican polipéptidos de Pseudomonas que pueden usarse para prevenir, diagnosticar y/o tratar una infección por Pseudomonas.

- 30 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

- 35 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 98 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % con un segundo polipéptido que comprende la SEC ID N°: 4.

- 40 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende la SEC ID N°: 4.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 98 % con un segundo polipéptido que comprende la SEC ID N°: 4.

Según un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionados de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

- 45 Según un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionados de la SEC ID N°: 4.

Según un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos caracterizados por una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos de los mismos.

Según un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos caracterizados por una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 4.

5 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4.

Según un aspecto, la presente invención se refiere a un epítipo que porta porciones de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

10 Según un aspecto, la presente invención se refiere a un epítipo que porta porciones de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido seleccionado de:

15 (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;

20 (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

(e) un polinucleótido que codifica un polipéptido capaz de generar anticuerpos que tengan especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: EC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

25 (f) un polinucleótido que codifica un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

(g) un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 3 o fragmentos o análogos del mismo;

(h) un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido de (a), (b), (c), (d), (e), (f) o (g).

30 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido seleccionado de:

(a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 4;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 4;

35 (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: la SEC ID N°: 4;

(e) un polinucleótido que codifica un polipéptido capaz de generar anticuerpos que tengan especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: la SEC ID N°: 4;

(f) un polinucleótido que codifica un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 4;

40 (g) un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 3;

(h) un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido de (a), (b), (c), (d), (e), (f) o (g).

Según un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende un polipéptido seleccionado de:

45 (a) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

(c) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

(d) un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

(e) un polipéptido capaz de obtener anticuerpos que tengan especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

5 (f) un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo;

(g) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que el resto de Met N-terminal está eliminado.

(h) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que la secuencia de aminoácidos secretores está eliminada.

10 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende un polipéptido seleccionado de:

(a) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°:

(c) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4;

15 (d) un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4;

(e) un polipéptido capaz de obtener anticuerpos que tengan especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4;

(f) un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 4;

20 (g) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que el resto de Met N-terminal está eliminado.

(h) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que la secuencia de aminoácidos secretora está eliminada.

25 Los expertos en la técnica apreciarán que la invención incluye moléculas de ADN, es decir, polinucleótidos, sus secuencias homólogas y sus secuencias complementarias, que codifican análogos tales como mutantes, variantes, homólogos y derivados de dichos polipéptidos, tal como se describe en la presente solicitud de patente. Los genes homólogos están evolutivamente relacionados, tienen secuencias similares y están estructuralmente relacionados. La invención también incluye moléculas de ARN que corresponden a las moléculas de ADN de la invención. Además de las moléculas de ADN y de ARN, la invención incluye los polipéptidos correspondientes y anticuerpos mono-específicos que se unen específicamente a dichos polipéptidos.

En otra realización, los polipéptidos según la presente invención son antigénicos.

30 En otra realización, los polipéptidos según la presente invención son inmunógenos.

En otra realización, los polipéptidos según la presente invención pueden provocar una respuesta inmunitaria en un huésped.

En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos que son capaces de generar anticuerpos que tienen especificidad de unión a los polipéptidos de la presente invención tal como se han definido anteriormente.

35 Un anticuerpo que "tiene especificidad de unión" es un anticuerpo que reconoce y se une al polipéptido seleccionado pero que no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. La unión específica puede medirse usando un ensayo ELISA en el que el polipéptido seleccionado se usa como un antígeno.

40 Según la presente invención, "protección" en los estudios biológicos se define por un aumento significativo en la curva, tasa o periodo de supervivencia. El análisis estadístico usando un ensayo de rango logarítmico para comparar curvas de supervivencia y el ensayo exacto de Fisher para comparar tasas de supervivencia y número de días hasta la muerte, respectivamente, pueden ser útiles para calcular valores de P y determinar si la diferencia entre los dos grupos es estadísticamente significativa. Valores de P de 0,05 se consideran como no significativos.

45 En un aspecto adicional de la invención se proporcionan fragmentos antigénicos/inmunógenos de los polipéptidos de la invención, o de análogos de los mismos.

Los fragmentos de la presente invención deberían incluir uno o más de dichas regiones epitópicas o ser lo suficientemente similares a dichas regiones para mantener sus propiedades antigénicas/inmunógenas. Por lo tanto, para fragmentos según la presente invención el grado de identidad es, quizás, irrelevante, debido a que pueden ser el 100 % idénticos a una parte particular de un polipéptido o análogo del mismo tal como se describe en el presente

documento. La presente invención también proporciona fragmentos que tienen al menos 20 restos de aminoácidos contiguos de las secuencias de polipéptidos de la presente invención.

5 El experto apreciará que los análogos de los polipéptidos de la invención también podrán usarse en el contexto de la presente invención, es decir, como material antigénico/inmunógeno. Por lo tanto, por ejemplo, proteínas o polipéptidos que incluyen una o más adiciones, deleciones, sustituciones o similares están abarcadas por la presente invención.

10 Tal como se usan en el presente documento, "fragmentos", "análogos" o "derivados" de los polipéptidos de la invención incluyen los polipéptidos en los que uno o más de los restos de aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente conservado) y que puede ser natural o no natural. En una realización, los derivados y análogos de polipéptidos de la invención tendrán una identidad superior al 90 % con las secuencias ilustradas en las figuras o fragmentos de los mismos. Es decir, el 90 % de los restos son los mismos.

15 En otra realización, los polipéptidos tendrán una identidad superior al 95 %. En otra realización, los polipéptidos tendrán una identidad superior al 99 %. En otra realización, los análogos de polipéptidos de la invención tendrán menos de aproximadamente 20 sustituciones, modificaciones o deleciones de restos de aminoácidos y más preferentemente menos de 10.

20 En otra realización, los polipéptidos tendrán una homología superior al 90 %. En otra realización, los polipéptidos tendrán una homología superior al 95 %. En otra realización, los polipéptidos tendrán una homología superior al 99 %. En otra realización, los derivados y análogos de polipéptidos de la invención tendrán menos de aproximadamente 20 sustituciones, modificaciones o deleciones de restos de aminoácidos y más preferentemente menos de 10. Las sustituciones preferentes son las conocidas en la técnica como conservadas, es decir, los restos sustituidos comparten propiedades físicas o químicas tales como hidrofobicidad, tamaño, carga o grupos funcionales.

25 Estas sustituciones son las que tienen una influencia mínima sobre la estructura secundaria y sobre la naturaleza hidropática del polipéptido. Las sustituciones preferentes son las conocidas en la técnica como conservadas, es decir, los restos sustituidos comparten propiedades físicas o químicas tales como hidrofobicidad, tamaño, carga o grupos funcionales. Estas incluyen sustituciones tales como las descritas por Dayhoff, M. en Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 y por Argos, P. en EMBO J. 8, 779-785, 1989. Por ejemplo, aminoácidos, bien naturales o bien no naturales, que pertenecen a uno de los grupos siguientes representan cambios conservativos:

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;

cys, ser, tyr, thr;

30 val, ile, leu, met, ala, phe;

lys, arg, orn, his;

and phe, tyr, trp, his.

Las sustituciones preferentes también incluyen sustituciones de D-enantiómeros para los L-aminoácidos correspondientes.

35 En un enfoque alternativo, los análogos podrían ser proteínas de fusión que incorporen restos que hagan la purificación más sencilla, por ejemplo, marcando eficazmente el polipéptido deseado. Puede ser necesario retirar el "marcador" o se puede dar el caso de que el propio polipéptido de fusión mantenga una antigenicidad suficiente para ser útil.

40 El porcentaje de homología se define como la suma del porcentaje de identidad más el porcentaje de similitud o conservación del tipo de aminoácido.

45 En una realización, los análogos de polipéptidos de la invención tendrán una homología de aproximadamente el 90 % con las secuencias ilustradas en las figuras o fragmentos de las mismas. En otra realización, los polipéptidos tendrán una homología superior al 95 %. En otra realización, los polipéptidos tendrán una homología superior al 99 %. En otra realización, los análogos de polipéptidos de la invención tendrán menos de aproximadamente 20 sustituciones, modificaciones o deleciones de restos de aminoácidos y más preferentemente menos de 10.

50 Se puede usar un programa tal como el programa CLUSTAL para comparar secuencias de aminoácidos. Este programa compara secuencias de aminoácidos y encuentra el alineamiento óptimo insertando espacios en cualquiera de las secuencias según sea apropiado. Es posible calcular la identidad u homología de los aminoácidos para un alineamiento óptimo. Un programa como BLASTx alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor al ajuste. De este modo es posible obtener una comparación en la que se encuentran varias regiones de similitud, teniendo cada una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis de identidad están contemplados en la presente invención.

En un enfoque alternativo, los análogos o derivados podrían ser polipéptidos de fusión que incorporen restos que

hagan la purificación más sencilla, por ejemplo marcando eficazmente la proteína o polipéptido deseado; puede ser necesario retirar el "marcador" o se puede dar el caso de que el propio polipéptido de fusión mantenga una antigenicidad suficiente para ser útil.

5 Es bien sabido que es posible someter a cribado un polipéptido antigénico para identificar regiones epitópicas, es decir, las regiones que son responsables de la antigenicidad o inmunogenicidad del polipéptido. Se conocen bien en la técnica procedimientos para llevar a cabo dicho cribado. Por lo tanto, los fragmentos de la presente invención deberían incluir una o más de dichas regiones epitópicas o ser suficientemente similares a estas regiones para mantener sus propiedades antigénicas/inmunógenas.

10 En un aspecto adicional de la invención se proporcionan fragmentos antigénicos/inmunógenos de las proteínas o polipéptidos de la invención, o de los análogos o derivados de las mismas.

Por lo tanto, lo que es importante para análogos, derivados y fragmentos es que posean al menos un grado de la antigenicidad/inmunogenicidad de la proteína o polipéptido de la que se derivan.

15 También están incluidos polipéptidos a los que se han fusionado otros compuestos que alteran las propiedades biológicas o farmacológicas de los polipéptidos, es decir, polietilenglicol (PEG) para aumentar la semivida; secuencias de aminoácidos líderes o secretoras para facilitar la purificación; prepro- y pro-secuencias; y (poli)sacáridos.

Además, en aquellas situaciones en las que se encuentra que las regiones de aminoácidos son polimórficas, puede ser deseable variar uno o más aminoácidos particulares para imitar más eficazmente los diferentes epitopos de las diferentes cepas de *Pseudomonas*.

20 Además, los polipéptidos de la presente invención se pueden modificar por acilación del -NH<sub>2</sub> terminal (por ejemplo, mediante acetilación, o amidación del ácido tioglicólico, amidación carboxi terminal, por ejemplo, con amoniaco o metilamina) para proporcionar estabilidad, aumentar la hidrofobicidad para el enlace o la unión a un soporte o a otra molécula.

25 También se contemplan multímeros heteropolipeptídicos y homopolipeptídicos de los fragmentos y análogos de los polipéptidos. Estas formas poliméricas incluyen, por ejemplo, uno o más polipéptidos que se han entrecruzado con entrecruzadores tales como avidina/biotina, glutaraldehído o dimetil-superimidato. Dichas formas poliméricas también incluyen polipéptidos que contienen dos o más secuencias contiguas en tándem o invertidas, producidas a partir de ARNm multicistronicos generados mediante tecnología de ADN recombinante.

30 En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden uno o más polipéptidos o fragmentos o análogos de los mismos tal como se definen en las figuras de la presente solicitud.

En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden dos o más polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada de las SEC ID N<sup>o</sup>: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos de los mismos; siempre que los polipéptidos estén unidos formando polipéptidos quiméricos.

35 En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden dos o más polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada de las SEC ID N<sup>o</sup>: 2, 4, 6, 8, 10 o 12 siempre que los polipéptidos estén unidos formando un polipéptido quimérico.

Preferentemente, un fragmento, análogo o derivado de un polipéptido de la invención comprenderá al menos una región antigénica, es decir, al menos un epítipo.

40 Para lograr la formación de polímeros antigénicos (es decir, multímeros sintéticos), se pueden usar polipéptidos que tengan grupos bishaloacetilo, nitroarilhaluros o similares, en los que los reactivos son específicos para grupos tio. Por lo tanto, la unión entre dos grupos mercapto de los diferentes polipéptidos puede ser un enlace sencillo o puede estar compuesta de un grupo de unión de al menos dos, típicamente al menos cuatro, y no más de 16, pero generalmente no más de aproximadamente 14 átomos de carbono.

45 En una realización particular, los fragmentos y análogos del polipéptido de la invención no contienen un resto inicial de metionina (Met). Preferentemente, los polipéptidos no incorporarán una secuencia líder o secretora (secuencia señal). La porción señal de un polipéptido de la invención se puede determinar según técnicas de biología molecular establecidas. En general, el polipéptido de interés se puede aislar a partir de un cultivo de *Pseudomonas* y secuenciarse subsiguientemente para determinar el resto inicial de la proteína madura y, por tanto, la secuencia del polipéptido maduro.

50 Dicho fragmento inmunógeno puede incluir, por ejemplo, el polipéptido de la invención que carece de un péptido líder N-terminal y/o un dominio transmembranal y/o bucles y/o giros externos.

La presente invención también proporciona un fragmento de un polipéptido que comprende sustancialmente todos los dominios extracelulares de un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 70 %, preferentemente una identidad del 80 %, más preferentemente una identidad del 95 %, con un segundo polipéptido que comprende las

SEC I.D. Nº 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo, a lo largo de toda la longitud de dicha secuencia.

Se entiende que los polipéptidos se pueden producir y/o usar sin su codón de iniciación (metionina o valina) y/o sin su péptido líder para favorecer la producción y purificación de polipéptidos recombinantes. Se sabe que la clonación de genes sin secuencias que codifican péptidos líder restringirá los polipéptidos al citoplasma de *E. coli* y facilitará su recuperación (Glick, B.R. y Pasternak, J.J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. En "Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA", 2ª edición, ASM Press, Washington DC, p. 109-143).

Según otro aspecto de la invención, también se proporciona (i) una composición de materia que contiene un polipéptido de la invención, junto con un vehículo, diluyente o coadyuvante; (ii) una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención y un vehículo, diluyente o coadyuvante; (iii) una vacuna que comprende un polipéptido de la invención y un vehículo, diluyente o coadyuvante; (iv) un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra Pseudomonas, en un huésped, administrando al huésped una cantidad inmunogénicamente eficaz de un polipéptido de la invención para provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora a Pseudomonas; y particularmente, (v) un procedimiento para prevenir y/o tratar una infección por Pseudomonas, administrando una cantidad profiláctica o terapéutica de un polipéptido de la invención a un huésped con necesidad de ello.

Según otro aspecto de la invención, también se proporciona (i) una composición de materia que contiene un polinucleótido de la invención, junto con un vehículo, diluyente o coadyuvante; (ii) una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido de la invención y un vehículo, diluyente o coadyuvante farmacéuticamente aceptable; (iii) un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra Pseudomonas, en un huésped, administrando al huésped una cantidad inmunogénicamente eficaz de un polinucleótido de la invención para provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora a Pseudomonas; y particularmente, (iv) un procedimiento para prevenir y/o tratar una infección por Pseudomonas, administrando una cantidad profiláctica o terapéutica de un polinucleótido de la invención a un huésped con necesidad de ello.

Según otro aspecto de la invención, también se proporciona (i) una composición de materia que contiene un polipéptido de la invención, junto con un liposoma, vehículo, diluyente o coadyuvante; (ii) una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención y un liposoma, vehículo, diluyente o coadyuvante; (iii) una vacuna que comprende un polipéptido de la invención y un liposoma, vehículo, diluyente o coadyuvante; (iv) un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra P. aeruginosa, en un huésped, administrando al huésped una cantidad inmunogénicamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención para provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora a P. aeruginosa; y particularmente, (v) un procedimiento para prevenir y/o tratar una infección por P. aeruginosa, administrando una cantidad profiláctica o terapéutica de una composición farmacéutica de la invención a un huésped con necesidad de ello.

Según otro aspecto de la invención, también se proporciona (i) una composición de materia que contiene un polinucleótido de la invención, junto con un liposoma, vehículo, diluyente o coadyuvante; (ii) una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido de la invención y un liposoma, vehículo, diluyente o coadyuvante; (iii) un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra P. aeruginosa, en un huésped, administrando al huésped una cantidad inmunogénicamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención para provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora a P. aeruginosa; y particularmente, (iv) un procedimiento para prevenir y/o tratar una infección por P. aeruginosa, administrando una cantidad profiláctica o terapéutica de una composición farmacéutica de la invención a un huésped con necesidad de ello.

En otra realización, los polipéptidos de la invención están asociados con los liposomas.

Tal como se usa en el presente documento, "asociado con" significa que los polipéptidos de la invención están al menos parcialmente embebidos en la membrana del liposoma, y preferentemente no están unidos covalentemente a los lípidos. Los polipéptidos también pueden unirse a una cola de ácido graso lipídica que a su vez está embebida en la membrana.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma asociado con polipéptidos según la presente invención son antigénicas.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma asociado con polipéptidos según la presente invención son inmunógenas.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma asociado con polipéptidos según la presente invención pueden provocar una respuesta inmunitaria en un huésped.

En otra realización, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma asociado con polipéptidos que son capaces de generar anticuerpos que tienen especificidad de unión a los polipéptidos de la presente invención tal como se han definido anteriormente.

En un aspecto adicional de la invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma

asociado con fragmentos inmunógenos y/o antigénicos de los polipéptidos de la invención, o de análogos de los mismos.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma asociado con fragmentos que comprenden un epítipo de linfocito B o de linfocito T colaborador.

- 5 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma asociado con fragmentos que pueden ser parte de un polipéptido más grande. Puede ser ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias secretoras o líderes, o secuencias que ayudan en la purificación tales como restos de histidina múltiples, o una secuencia adicional que aumenta la estabilidad durante la producción recombinante, o secuencias adicionales de una cola polipeptídica o lipídica que aumenta el potencial inmunógeno del polipéptido final.

10 El experto apreciará que las composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma asociado con análogos de los polipéptidos de la invención también podrán usarse en el contexto de la presente invención, es decir, como material antigénico/inmunógeno. Por lo tanto, por ejemplo, proteínas o polipéptidos que incluyen una o más adiciones, deleciones, sustituciones o similares están abarcadas por la presente invención.

- 15 En otra realización, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un liposoma asociado con polipéptidos quiméricos que comprenden uno o más polipéptidos o fragmentos o análogos de la invención.

20 Los liposomas están hechos de fosfolípidos y otras moléculas anfóteras polares que forman membranas de dos capas concéntricas cerradas [resumido en Gregoriades, G., *Immunology Today*, 11, 3, 89 (1990); Lasic, D., *American Scientist*, 80, p. 20 (1992); Remington's on Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> ed., 1990, Mack Publishing Co., Pennsylvania., p.1691]. El constituyente principal de los liposomas son lípidos que tienen una "cabeza" hidrófila polar unida a una "cola" hidrófoba, no polar, larga. La cabeza hidrófila consiste típicamente en un grupo fosfato, mientras que la cola hidrófoba está hecha de dos cadenas de hidrocarburo largas. Debido a que las moléculas de lípidos tienen una parte que es hidrosoluble y otra parte que no lo es, tienden a juntarse en estructuras ordenadas que secuestran las colas hidrófobas de moléculas de agua. En el proceso, los liposomas pueden atrapar agua y solutos en su interior, o también pueden incorporarse directamente moléculas con regiones hidrófobas en membranas de liposomas. Muchos fosfolípidos, solos o en combinación, formarán liposomas con otros lípidos. Por convención, los liposomas se dividen en categorías por tamaño, y se usa un acrónimo de 3 letras para designar el tipo de liposoma que se está tratando. Las vesículas multilaminares se designan "MLV", las vesículas unilaminares grandes "LUV", las vesículas unilaminares pequeñas "SUV". Estas denominaciones vienen algunas veces seguidas por la composición del liposoma. Se describen la nomenclatura y un resumen de liposomas conocidos por Storm y col., 1998, PSIT, 1:19-31. Los liposomas son eficaces en ayudar proteínas de membrana a replegarse y también son coadyuvantes eficaces que refuerzan la respuesta inmunitaria humoral, así como la celular, contra un antígeno.

- 35 La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas constituidos por fosfolípidos. Estos fosfolípidos pueden sintetizarse o extraerse de células bacterianas, soja, huevos.

La invención proporciona un procedimiento para la incorporación de polipéptidos de la invención en formulaciones de liposomas diferentes.

Los liposomas pueden prepararse con diversos fosfolípidos sintéticos (lista 1) o fosfolípidos bacterianos y/o colesterol, que pueden combinarse en proporciones diferentes.

- 40 La invención proporciona un procedimiento para extraer lípidos de células bacterianas para generar formulaciones de liposomas de origen bacteriano. Las mezclas de lípidos complejas pueden extraerse de varias especies bacterianas. Estas especies podrían incluir pero sin limitación: *Neisseria* spp, *Haemophilus* spp, *Pseudomonas* spp, *Bacteriodes* spp, *Legionella* spp, *Vibrio* spp, *Brucella* spp, *Bordetella* spp, *Campylobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Proteus* spp y *Yersinia* spp. Pueden encontrarse otras especies en el manual Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974) (Baltimore).

- 45 Los liposomas de la invención pueden prepararse a partir de una variedad de lípidos formadores de vesícula que incluyen fosfatidil-ésteres y ésteres, tales como fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerina (PG) y fosfatidilcolina (PC), pero también a partir de glicéridos, tales como dioleoilglicerosuccinato; cerebrósidos; gangliósidos, esfingomielina; esteroides, tales como colesterol; y otros lípidos, así como excipientes tales como palmitato de vitamina E o vitamina C.

La fluidez y estabilidad de las membranas de liposomas dependerá de la temperatura de transición (temperatura a la que las regiones de hidrocarburo cambian de un estado cuasicristalino a más fluido) de los fosfolípidos.

- 55 Las modificaciones de fluidez de membrana, número de láminas, tamaño de vesícula, carga superficial, proporción de lípidos con respecto a antígenos y localización del antígeno dentro de los liposomas puede modular la capacidad de coadyuvar de preparaciones de liposomas.

La preparación de liposomas puede realizarse mediante una serie de técnicas diferentes que incluyen inyección con etanol, infusión con éter, eliminación de detergente, evaporación de disolvente, evaporación de disolventes orgánicos a partir de emulsiones de cloroformo en agua; extrusión de vesículas multilamelares a través de una membrana de policarbonato nucleoporosa; congelación y descongelación de mezclas de fosfolípidos, así como sonicación y homogeneización.

Los lípidos pueden disolverse en un disolvente orgánico adecuado, o una mezcla de disolventes orgánicos adecuada, tal como solución de cloroformo:metanol en un matraz de vidrio de fondo redondo y se secan usando un evaporador rotatorio para lograr una película plana en el recipiente.

Antes de la inmunización, los polipéptidos de la invención también se pueden acoplar o conjugar a proteínas portadoras tales como la toxina del tétanos, toxina de la difteria, antígeno superficial del virus de la hepatitis B, antígeno VP1 del virus de la poliomielitis o a cualquier otra toxina o antígeno vírico o bacteriano o a cualquier proteína adecuada para estimular el desarrollo de una respuesta inmunitaria más fuerte. Este acoplamiento o conjugación se puede realizar química o genéticamente. Una descripción más detallada de la conjugación péptido-portador está disponible en Van Regenmortel, M.H.V., Briand J.P., Muller S., Plaué S., "Synthetic Polypeptides as antigens" en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol.19 (ed.) Burdou, R.H. y Van Knippenberg P.H. (1988), Elsevier Nueva York.

Según otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más polipéptidos *Pseudomonas* de la invención en una mezcla con un coadyuvante farmacéuticamente aceptable. Los coadyuvantes adecuados incluyen (1) formulaciones en emulsión de aceite en agua tales como MF59<sup>TM</sup>, SAF<sup>TM</sup>, Ribi<sup>TM</sup>; (2) coadyuvante completo o incompleto de Freund; (3) sales, es decir, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, AlNa(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, AlNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Al(OH)<sub>3</sub>, AlPO<sub>4</sub>, sílice, caolín; (4) derivados de saponina tales como Stimulon<sup>TM</sup> o partículas generadas a partir de los mismos como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores); (5) citocinas tales como interleucinas, interferones, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF); (6) otras sustancias tales como polinucleótidos de carbono, es decir, poli IC y poli AU, toxina del cólera detoxificada (CTB) y toxina térmicamente lábil de *E. coli* para la inducción de inmunidad en la mucosa; (7) liposomas. Una descripción más detallada de coadyuvantes está disponible en una revisión por M.Z.I. Khan y col. en Pharmaceutical Research, vol. 11, N° 1 (1994) páginas 2-11, y también en otra revisión por Gupta y col., en Vaccine, Vol. 13, N° 14, páginas 1263-1276 (1995) y en el documento WO 99/24578. Los coadyuvantes preferentes incluyen QuilA<sup>TM</sup>, QS21<sup>TM</sup>, Alhydrogel<sup>TM</sup> y Adjuphos<sup>TM</sup>.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por vía parenteral mediante inyección, infusión rápida, absorción nasofaríngea, absorción dérmica, o por vía bucal u oral.

La expresión "composición farmacéutica" también se pretende que incluya anticuerpos. Según la presente invención, también se proporciona el uso de uno o más anticuerpos que tienen especificidad de unión por los polipéptidos de la presente invención para su uso en el tratamiento o prevención de infección por *Pseudomonas* y/o enfermedades y síntomas mediados por infección por *Pseudomonas*.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se usan para la prevención o el tratamiento de infección por *Pseudomonas* y/o enfermedades y síntomas mediados por infección por *Pseudomonas* tal como se describe en Manual of Clinical Microbiology, P.R. Murray (Ed, en jefe), E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover y R.H. Tenover. ASM Press, Washington, D.C. 7ª edición, 1999, 1773 p. y en Campa, M. y col. (Eds.) *Pseudomonas aeruginosa* as. an opportunistic pathogen (1993) Plenum Press, NY, 419 p.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se usan para la prevención o el tratamiento de infecciones nosocomiales, especialmente en individuos inmunodeprimidos tales como neumonía asociada a ventilador en pacientes entubados, bacteremia en pacientes con quemaduras, infección crónica en pacientes con fibrosis quística y septicemia. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se usan para el tratamiento o la prevención de infección por *Pseudomonas* y/o enfermedades y síntomas mediados por infección por *Pseudomonas*. En otra realización, la infección por *Pseudomonas* está mediada por *Pseudomonas aeruginosa*. En otra realización, la infección por *Pseudomonas* está mediada por *Pseudomonas stutzeri*.

En una realización particular, las composiciones farmacéuticas se administran a los huéspedes con riesgo de infección por *Pseudomonas* tales como niños pequeños, personas mayores y huéspedes inmunodeprimidos y también pacientes hospitalizados, pacientes con fibrosis quística, personas susceptibles de sufrir quemaduras tales como bomberos o personal militar.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término "huésped" incluye mamíferos. En otra realización, el mamífero es un ser humano.

Las composiciones farmacéuticas preferentemente están en una forma farmacéutica unitaria de 0,001 a 100 µg/kg aproximadamente (antígeno/peso corporal) y más preferentemente de 0,01 a 10 µg/kg y del modo más preferente de 0,1 a 1 µg/kg de 1 a 3 veces con un intervalo de aproximadamente 1 a 6 semanas entre inmunizaciones.

Las composiciones farmacéuticas preferentemente están en una forma farmacéutica unitaria de 0,1 µg a 10 mg

aproximadamente y más preferentemente de  $\mu\text{g}$  a 1 mg y del modo más preferentemente de 10 a 100  $\mu\text{g}$  de 1 a 3 veces con un intervalo de aproximadamente 1 a 6 semanas entre inmunizaciones.

Según otro aspecto, se proporcionan polinucleótidos que codifican polipéptidos caracterizados por la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos de los mismos.

5 En una realización, los polinucleótidos son los ilustrados en la SEC ID N°: 3 que pueden incluir los marcos de lectura abiertos (ORF), que codifican los polipéptidos de la invención.

Se apreciará que las secuencias de polinucleótidos ilustradas en las figuras pueden estar alteradas con codones degenerados y aún así codificar los polipéptidos de la invención. En consecuencia, la presente invención proporciona también polinucleótidos que se hibridan con las secuencias de polinucleótidos descritas anteriormente en el presente documento (o secuencias complementarias a las mismas) que tienen una identidad de al menos el 90 % entre secuencias. En otra realización, los polinucleótidos se hibridan en condiciones restrictivas, es decir, que tienen una identidad de al menos el 95 %. En otra realización, una identidad superior al 97 %. Se pueden determinar fácilmente condiciones restrictivas adecuadas para la hibridación por parte de un experto de la técnica (véase por ejemplo Sambrook y col., (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology, (1999) editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley & Sons, Inc., N.Y.).

15 En otra realización, la presente invención proporciona polinucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas a bien

(a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien

(b) el complementario de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

20 comprendiendo dicho polipéptido una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

En otra realización, la presente invención proporciona polinucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas a bien

(a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien

(b) el complementario de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

25 comprendiendo dicho polipéptido al menos 10 restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

En otra realización, la presente invención proporciona polinucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas a bien

(a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien

30 (b) el complementario de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

comprendiendo dicho polipéptido al menos 20 restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 4 o fragmentos o análogos del mismo.

En otra realización, la presente invención proporciona polinucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas a bien

35 (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien

(b) el complementario de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

comprendiendo dicho polipéptido al menos restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 4

40 En otra realización, los polinucleótidos son los que codifican polipéptidos de la invención ilustrados en la SEC ID N°: 4.

En otra realización, los polinucleótidos son los ilustrados en la SEC ID N°: 3 que codifican polipéptidos de la invención.

Como apreciará fácilmente alguien experto en la materia, los polinucleótidos incluyen tanto ADN como ARN.

45 La presente invención también incluye polinucleótidos complementarios a los polinucleótidos descritos en la presente solicitud.

Según otro aspecto, se proporciona un procedimiento para la producción de polipéptidos de la invención mediante

técnicas recombinantes expresando un polinucleótido que codifica dicho polipéptido en una célula huésped y recuperando el producto del polipéptido expresado. Alternativamente, los polipéptidos se pueden producir según técnicas de síntesis química establecidas, es decir, síntesis en fase sólida o en fase de disolución de oligopéptidos que están ligados para producir el polipéptido completo (ligación en bloque).

- 5 Se describen procedimientos generales para la obtención y evaluación de polinucleótidos y polipéptidos en las siguientes referencias: Sambrook y col, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley and Sons, Inc. Nueva York; *PCR Cloning Protocols*, de *Molecular Cloning to Genetic Engineering*, editado por White B.A., Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 1997, 490 páginas; *Protein Purification, Principles and Practices*, Scopes R.K., Springer-Verlag, Nueva York, 3ª edición, 1993, 380 páginas; *Current Protocols in Immunology*, editado por Coligan J.E. y col., John Wiley & Sons Inc., Nueva York.

La presente invención proporciona células huésped transfectadas con vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención

- 15 La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido que comprende el cultivo de una célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido.

Para la reproducción recombinante, se transfectan células huésped con vectores que codifican los polipéptidos de la invención, y después se cultivan en un medio nutriente modificado según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes. Los vectores adecuados son los que son viables y replicables en el huésped seleccionado e incluyen secuencias cromosómicas, no cromosómicas y de ADN sintético, por ejemplo, plásmidos bacterianos, ADN fágico, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fágico. La secuencia polipeptídica se puede incorporar al vector en el sitio apropiado usando enzimas de restricción de manera que esté operativamente unida a una región de control de la expresión que comprende un promotor, un sitio de unión a ribosomas (región consenso o secuencia de Shine-Dalgarno), y opcionalmente un operador (elemento de control). Se pueden seleccionar componentes individuales de la región de control de la expresión que sean apropiados para un huésped y un vector dados según principios de biología molecular establecidos (Sambrook y col, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley and Sons, Inc. Nueva York). Los promotores adecuados incluyen, pero sin limitación, el promotor de LTR o SV40, los promotores lac, tac o trp de *E. coli* y el promotor P<sub>L</sub> del fago lambda. Los vectores incorporarán preferentemente un origen de replicación, así como marcadores de selección, es decir, un gen de resistencia a ampicilina. Los vectores bacterianos adecuados incluyen pET, pQE70, pQE60, pQE-9, pD10 phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 y los vectores eucariotas pBlueBacIII, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL. Las células huésped pueden ser bacterianas, es decir, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*; fúngicas, es decir, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*; de levadura, es decir, *Saccharomyces* o eucariotas, es decir, CHO, COS.

Tras la expresión del polipéptido en cultivo, las células se recogen típicamente por centrifugación y después se rompen por medios físicos o químicos (si el polipéptido expresado no es secretado al medio) y el extracto bruto resultante es retenido para aislar el polipéptido de interés. La purificación del polipéptido a partir del medio de cultivo o del lisado se puede lograr mediante técnicas establecidas en función de las propiedades del polipéptido, es decir, usando precipitación con sulfato de amonio o con etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. La purificación final se puede lograr usando HPLC.

Los polipéptidos se pueden expresar con o sin una secuencia líder o de secreción. En este último caso la secuencia líder se puede eliminar usando procesamiento postraduccionnal (véanse los documentos US 4.431.739; US 4.425.437 y US 4.338.397) o se puede eliminar químicamente después de purificar el polipéptido expresado.

Según un aspecto adicional, los polipéptidos de *Pseudomonas* de la invención se pueden usar en un ensayo de diagnóstico para la infección por *Pseudomonas*, en particular la infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

50 Son posibles diversos procedimientos diagnósticos para la infección por *Pseudomonas* en un huésped susceptible a infección por *Pseudomonas*, por ejemplo, para detectar organismos de *Pseudomonas* en una muestra biológica, se puede realizar el procedimiento siguiente:

(a) obtener una muestra biológica de un huésped;

(b) incubar un anticuerpo o uno de sus fragmentos reactivo con un polipéptido de *Pseudomonas* de la invención con la muestra biológica para formar una mezcla; y

55 (c) detectar el anticuerpo o fragmento unido específicamente en la mezcla que indica la presencia de *Pseudomonas*.

Alternativamente, un procedimiento de diagnóstico para la infección por *Pseudomonas* en un huésped susceptible a

la infección por Pseudomonas incluye un procedimiento para la detección de anticuerpo específico para un antígeno de Pseudomonas en una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene dicho anticuerpo que puede realizarse del modo siguiente:

- (a) obtener una muestra biológica de un huésped;
- 5 (b) incubar uno o más polipéptidos de Pseudomonas de la invención o sus fragmentos con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- (c) detectar el antígeno o fragmento unido específicamente en la mezcla que indica la presencia de anticuerpo específico para Pseudomonas.

10 Un experto en la técnica reconocerá que este ensayo de diagnóstico puede adoptar diversas formas, incluidas un ensayo inmunológico tal como un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo o un ensayo de aglutinación con látex, esencialmente para determinar si hay presencia en un organismo de anticuerpos específicos para el polipéptido.

15 Las secuencias de ADN que codifican polipéptidos de la invención también se pueden usar para diseñar sondas de ADN para usar en la detección de la presencia de Pseudomonas en una muestra biológica sospechosa de contener dicha bacteria. Ese procedimiento de detección de la presente invención comprende:

- (a) obtener una muestra biológica de un huésped;
- (b) incubar una o más sondas de ADN que tienen una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la invención o sus fragmentos con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- 20 (c) detectar la sonda de ADN unida específicamente en la mezcla que indica la presencia de bacterias Pseudomonas.

25 Las sondas de ADN descritas en el presente documento también se pueden usar para detectar Pseudomonas circulantes, es decir, ácidos nucleicos de Pseudomonas en una muestra, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa, como procedimiento de diagnóstico de infecciones por Pseudomonas. La sonda se puede sintetizar usando técnicas convencionales y se puede inmovilizar sobre una fase sólida, o se puede marcar con un marcador detectable. Una sonda de ADN preferente para la presente solicitud es un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 6 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de Pseudomonas de la invención. En otra realización, la sonda de ADN preferente será un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de Pseudomonas de la invención. En otra realización, la sonda de ADN preferente será un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 30 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de Pseudomonas de la invención. En otra realización, la sonda de ADN preferente será un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de Pseudomonas de la invención.

Otro procedimiento diagnóstico para la detección de Pseudomonas en un huésped comprende:

- 35 (a) marcar un anticuerpo reactivo con un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo con un marcador detectable;
- (b) administrar el anticuerpo marcado o el fragmento marcado al huésped; y
- (c) detectar el anticuerpo marcado o el fragmento marcado unido específicamente en el huésped que indica la presencia de Pseudomonas.

40 En otro aspecto, pueden usarse polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención, o fragmentos, análogos o derivados de los mismos, en un procedimiento de inmunización de ADN. Es decir, pueden incorporarse en un vector que sea replicable y pueda expresarse después de la inyección, produciendo de este modo el polipéptido antigénico in vivo. Por ejemplo, pueden incorporarse polinucleótidos en un vector plásmido con el control del promotor CMV que es funcional en células eucariotas. Preferentemente el vector se inyecta por vía intramuscular.

45 Otro aspecto de la invención es el uso de polipéptidos de Pseudomonas de la invención como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos para el diagnóstico y, en particular, el tratamiento de infección por Pseudomonas.

50 Otro aspecto de la invención es el uso de los anticuerpos dirigidos a los polipéptidos de la invención para la inmunización pasiva, administrándose un anticuerpo generado por un polipéptido de la invención a un huésped en una cantidad suficiente para proporcionar una inmunización pasiva. Se podrían usar los anticuerpos descritos en la presente solicitud. Los anticuerpos adecuados se pueden determinar usando procedimientos de cribado apropiados, por ejemplo, midiendo la capacidad de un anticuerpo particular para proteger pasivamente contra la infección por Pseudomonas en un modelo de ensayo. Un ejemplo de un modelo animal es el modelo de ratón descrito en los

ejemplos del presente documento. El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o uno de sus fragmentos de unión al antígeno y puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina. El anticuerpo o el fragmento pueden ser de origen animal, específicamente de origen mamífero y más específicamente de origen murino, de rata o humano. Puede ser un anticuerpo natural o un fragmento del mismo, o si se desea, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo recombinante. La expresión anticuerpo o fragmento de anticuerpo recombinante significa anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se produce usando técnicas de biología molecular. El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpos pueden ser policlonales, o preferentemente monoclonales. Pueden ser específicos para una serie de epítopos asociados a los polipéptidos de Pseudomonas, pero preferentemente es específico para uno.

El uso de un polinucleótido de la invención en inmunización genética usará preferentemente un procedimiento o sistema de administración adecuado tal como inyección directa de ADN de plásmido en los músculos [Wolf y col. H M G (1992) 1: 363; Turnes y col., Vaccine (1999), 17 : 2089; Le y col., Vaccine (2000) 18 : 1893; Alves y col., Vaccine (2001) 19 : 788], inyección de ADN de plásmido con o sin coadyuvantes [Ulmer y col., Vaccine (1999) 18: 18; MacLaughlin y col., J. Control Release (1998) 56: 259; Hartikka y col., Gene Ther. (2000) 7: 1171-82; Benvenisty y Reshef, PNAS USA (1986) 83:9551; Singh y col., PNAS USA (2000) 97: 811], células dirigidas mediante la administración de ADN acompañado con vehículos específicos [Wa y col., J Biol Chem (1989) 264: 16985; Chaplin y col., Infect. Immun. (1999) 67: 6434], inyección de plásmido acompañado a, o encapsulado en, diversas formas de liposomas [Ishii y col., AIDS Research and Human Retroviruses (1997) 13: 142; Perrie y col., Vaccine (2001) 19: 3301], administración de ADN con procedimientos diferentes de bombardeo [Tang y col., Nature (1992) 356: 152; Eisenbraun y col., DNA Cell Biol (1993) 12: 791; Chen y col., Vaccine (2001) 19: 2908], y la administración de ADN con vectores vivos [Tubulekas y col., Gene (1997) 190: 191; Pushko y col., Virology (1997) 239: 389; Sprerig y col. FEMS (2000) 27: 299; Dietrich y col., Vaccine (2001) 19: 2506].

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el tratamiento profiláctico y terapéutico de infección por Pseudomonas en un huésped susceptible a la infección por Pseudomonas que comprende administrar al huésped una cantidad profiláctica o terapéutica de una composición farmacéutica de la invención.

En otra realización, la invención proporciona el uso de una composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por Pseudomonas.

En otra realización, la invención proporciona un kit que comprende un polipéptido de la invención para la detección o el diagnóstico de una infección por Pseudomonas.

A menos de que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen los mismos significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

## EJEMPLO 1

Este ejemplo ilustra la clonación y características moleculares del gen SPA-1 y polipéptidos correspondientes.

La región codificante del gen SPA-1 de P.aeruginosa (SEC ID N°: 1) se amplificó por PCR (Hybaid PCR Express, ESBE Scientific, Markham, Ontario, Canadá) de ADN genómico de la cepa de P. aeruginosa PAO1 usando los oligos siguientes que contenían extensiones de base para la adición de sitios de restricción *NdeI* (CATATG) y *NotI* (GCGGCCGC): PSEU59 (5'-GGGAATTCCATATGGCGCAGAAGAATCCGACAGTCCG-3') y PSEU60 (5'-ATAAGAATGCGGCCGCTGGCGTCCQCAGGCGGT-3'). Los productos de PCR se purificaron a partir de gel de agarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Chatsworth, CA) y se digirieron con *NdeI* y *NotI* (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfé, Canadá). El vector pET21b(+) (Novagen, Madison, WI) se digirió con *NdeI* y *NotI* y se purificó a partir de gel de agarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). Los productos de PCR *NdeI-NotI* se ligaron al vector de expresión *NdeI-NotI* pET21b(+). Los productos ligados se transformaron en cepas de E. coli DH5 $\alpha$  [ $\Delta$ 80d/*lacZ* $\Delta$ M15 $\Delta$ (*acZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>*+*) deoR thi-1 supE44  $\lambda$ .gyrA96 relA1*] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) según el procedimiento de Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), páginas 109-135). El plásmido pET21b(+) recombinante (rpET21b(+)) que contenía el gen SPA-1 se purificó usando un kit de Qiagen y se secuenció un inserto de ADN (kit Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing, ABI, Foster City, CA).

Tabla 1. Cebadores oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR de genes de *P. aeruginosa*

Genes	Cebadores I.D.	Sitio de restricción	Vector	Secuencia	Secuencia I.D. N°
SPA-1	PSEU59	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5' - GGGAATTCATATGGCGCAGA AGAATCCGACAGTCG -3'	7
EPA-1	PSEU60	<i>Not</i> I	pET21b (+)	5' - ATAAGAATGCGGCCGCTGGCG TCCGAGGGCGGT -3'	8
SPA-1	PSEU409	<i>Bgl</i> II	PCMV-GH	5' - GGGCAGATCTTGATGGCGCAG AAGAATCCG-3'	9
SPA-1	PSEU410	<i>Xba</i> I	pCMV-GH	5' - GATCCTCTAGATTGGCGTCCG CAGGCGGTC-3'	10
SPA-2	PSEU47	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5' - GGGAATTCATATGGGCTTCC AACTGCGCGG-3'	11
SPA-2	PSEU48	<i>Hind</i> III	pET21b (+)	5' - CGCCAAGCTTCGGGGTGGGGA ACTCGAT-3'	12
SPA-2	PSEU411	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5' - CGAGGATCCTATGTGCGGCTT CCAACTGCG-3'	13
SPA-2	PSEU412	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5' - CAGAAGCTTCGGGGTGGGGAA CTCGATCGGC-3'	14
SPA-3	PSEU37	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5' - GGGAATTCATATGAGCAGCA ACAGCAAGAAGGA-3'	15
SPA-3	PSEU38	<i>Hind</i> III	pET21b (+)	5' - CGCCAAGCTTCGGGATGGTGT AGGCGAC-3'	16
SPA-3	PSEU413.	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5' - CGAGGATCCTATGAGCAAGAA GGA-3'	17
SPA-3	PSEU414	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5' - CAGAAGCTTCTAGCGGATTGG TGTAGGCGAC-3'	18

- 5 Se determinó que el marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido SPA-1 contiene 1347 pb y codifica un polipéptido de 448 restos de aminoácidos con una *pl* predicha de 8,20 y una masa molecular de 47757,95 Da. El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 2) usando el programa informático SpScan (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) sugirió la existencia de un péptido señal de 32 restos de aminoácidos (MRNPERSALLKVSGLLGSTVVAMGLGLSSACA) que termina con un sitio de escisión localizado entre un resto de alanina y un resto de glutamina.
- 10 Para confirmar la presencia por amplificación por PCR del gen SPA-1 (SEC ID N°:1) se usaron las 5 cepas de *P. aeruginosa* distintas siguientes: *P. aeruginosa* PAO1, NF25, NF45, 1019-5 y B. Los aislados clínicos se proporcionaron por el Centre de Recherche en Infectiologie (Laval University, Quebec, Canadá). La XL1-Blue MRF' de *E. coli* se usó en estos experimentos como control negativo. El gen SPA-1 (SEC ID N°:1) se amplificó por PCR

(Hybaid PCR Express, ESBE Scientific) a partir de ADN genómico de las 5 cepas de *P. aeruginosa* y la cepa de *E. coli* de control usando los cebadores de oligonucleótidos PSEU59 y PSEU60 (Tabla 1). La PCR se realizó con 10 ciclos de 10 s a 94 °C, 30 s a 45 °C y 2 min a 68 °C seguidos por 20 ciclos de 10 s a 94 °C, 30 s a 45 °C y 2 min con incrementos de 0,05 s por ciclo a 68 °C y un periodo de alargamiento final de 7 min a 68 °C. Los productos de PCR se fraccionaron por tamaño en geles de agarosa al 1 % y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los resultados de estas amplificaciones por PCR se presentan en la tabla 2. El análisis de los productos de amplificación reveló que el gen SPA-1 (SEC ID N°: 1) estaba presente en el genoma de todas las 5 cepas de *P. aeruginosa* analizadas. No se detectó dicho producto cuando se sometió el ADN de *E. coli* a amplificaciones por PCR idénticas con estos cebadores de oligonucleótidos.

Tabla 2. Identificación de genes de *P. aeruginosa* por amplificación por PCR

Identificación de la cepa	Identificación por amplificación por PCR de		
	SPA-1	SPA-2	SPA-3
PAO1	+	+	+
NF25	+	+	+
NF45	+	+	+
1019-5	+	+	+
B	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-

## EJEMPLO 2

Este ejemplo ilustra la clonación y características moleculares de genes SPA-2 y polipéptidos correspondientes.

La región de codificación del gen SPA-2 de *P.aeruginosa* (SEC ID N°: 3) se amplificó por PCR (Hybaid PCR Express, ESBE Scientific) de ADN genómico de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 usando los oligos siguientes que contenían extensiones de base para la adición de sitios de restricción *NdeI* (CATATG) y *HindIII* (AAGCTT): PSEU47 y PSEU48, que se presentan en la tabla 1. Los procedimientos usados para clonar genes SPA-2 en un vector de expresión y la secuenciación son similares a los procedimientos descritos en el ejemplo 1.

Se determinó que el marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido SPA-2 contiene 624 pb y codifica un polipéptido de 207 restos de aminoácidos con una *pI* predicha de 5,04 y una masa molecular predicha de 22882,24 Da. El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 4) usando el programa informático Spscan (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) sugirió la existencia de un péptido señal de 19 restos de aminoácidos (MKRILTSAALIGMTLLAA) que termina con un sitio de escisión localizado entre un resto de alanina y un resto de cisteína.

Se mostró que el gen SPA-2 estaba presente después de la amplificación por PCR usando los cebadores de nucleótidos PSEU47 y PSEU48 en las 5 cepas de *P. aeruginosa* analizadas (Tabla 2). Los procedimientos usados para la amplificación por PCR del gen SPA-2 fueron similares a los procedimientos presentados en el ejemplo 1. No se detectó dicho producto cuando se sometió el ADN de *E. coli* a amplificación por PCR idéntica con estos cebadores de oligonucleótidos.

## EJEMPLO 3

Este ejemplo ilustra la clonación y características moleculares de genes SPA-3 y polipéptidos correspondientes.

La región codificante del gen SPA-3 de *P.aeruginosa* (SEC ID N°: 5) se amplificó por PCR (Hybaid PCR Express, ESBE Scientific) de ADN genómico de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 usando los oligos siguientes que contenían extensiones de base para la adición de sitios de restricción *NdeI* (CATATG) y *HindIII* (AAGCTT): PSEU37 y PSEU38, que se presentan en la tabla 1. Los procedimientos usados para clonar genes SPA-3 en un vector de expresión y la secuenciación son similares a los procedimientos descritos en el ejemplo 1.

Se determinó que el marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido SPA-3 contiene 1143 pb y codifica un polipéptido de 380 restos de aminoácidos con una *pI* predicha de 5,15 y una masa molecular predicha de 40394,19 Da. El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 6) usando el programa informático Spscan (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) sugirió la existencia de un péptido señal de 21 restos de aminoácidos (MVQWKHAALLALALAWGCSS) que termina con un sitio de escisión localizado entre un resto de alanina y un resto de asparagina.

Se mostró que el gen SPA-3 estaba presente después de la amplificación por PCR usando los cebadores de nucleótidos PSEU37 y PSEU38 en las 5 cepas de *P. aeruginosa* analizadas (Tabla 2). Los procedimientos usados para la amplificación por PCR del gen SPA-3 fueron similares a los procedimientos presentados en el ejemplo 1. No se detectó dicho producto cuando se sometió el ADN de *E. coli* a amplificaciones PCR idénticas con estos cebadores de oligonucleótidos.

## EJEMPLO 4

Este ejemplo ilustra la clonación de genes de *P. aeruginosa* en el plásmido de CMV pCMV-GH.

Las regiones codificantes de ADN de polipéptidos de *P. aeruginosa* se insertaron en fase posteriormente cadena abajo a un gen de hormona de crecimiento humano (hGH) que estaba bajo el control transcripcional del promotor de citomegalovirus (CMV) en el vector plásmido pCMV-GH (Tang y col., Nature, 1992, 356 :152). El promotor de CMV es no funcional en células de *E. coli* pero activo después de la administración del plásmido en células eucariotas. El vector también incorpora el gen de resistencia a ampicilina.

Las regiones codificantes de los genes SPA-1 (SEC ID N°: 1), SPA-2 (SEC ID N°: 3), SPA-3 (SEC ID N°: 5) sin sus regiones de péptidos líder se amplificaron por PCR (Hybaid PCR Express, ESBE Scientific) a partir de AND genómico de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 usando cebadores de nucleótidos que contenían extensiones de base para la adición de sitios de restricción *Bam*HI (GGATCC), *Bgl*II (AGATCT), *Xba*I (TCTAGA) o *Hind*III (AAGCTT) que se describen en la tabla 1. Los productos de PCR se purificaron a partir de gel de agarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) y se digirieron con enzimas de restricción (Amersham Pharmacia Biotech, Inc). El vector pCMV-GH (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) se digirió con *Bam*HI, *Bgl*II, *Xba*I o *Hind*III y se purificó usando el kit de extracción en gel de agarosa QIAquick (Qiagen). Los fragmentos de ADN digeridos se ligaron al vector pCMV-GH digerido para crear los polipéptidos de fusión hGH-SPA-1, hGH-SPA-2 y hGH-SPA-3 bajo el control del promotor de CMV. Los productos ligados se transformaron en cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  [ $\lambda$ 80d/*lacZ* $\Delta$ M15 $\Delta$ (*acZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>*+) *deoR thi-1 supE44  $\lambda$ .gyrA96 reA1*] (Gibco BRL) según el procedimiento de Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), páginas 109-135). Los plásmidos pCMV recombinantes se purificaron usando un kit Qiagen y las secuencias de nucleótidos de los insertos de ADN se verificaron por secuenciación de ADN.

#### EJEMPLO 5

Este ejemplo ilustra el uso de ADN para provocar una respuesta inmunitaria a antígenos de polipéptido de *P. aeruginosa*.

Un grupo de 8 ratones BALB/c hembras (Charles River, St-Constant, Quebec, Canadá) se inmunizaron mediante inyección por vía intramuscular de 100  $\mu$ l tres veces en intervalos de dos o tres semanas con 50  $\mu$ g de pCMV-GH recombinante que codifica genes SPA-1 (SEC ID N°: 1), SPA-2 (SEC ID N°: 3) y SPA-3 (SEC ID N°: 5) en presencia de 50  $\mu$ g de plásmido que expresa el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) pCMV-GH-GM-CSF (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas). Como control, se inyectaron a un grupo de ratones 50  $\mu$ g de pCMV-GH en presencia de 50  $\mu$ g de pCMV-GH-GM-CSF. Se recogieron muestras de sangre de la cavidad orbitaria antes de cada inmunización y siete días después de la tercera inyección. Las respuestas de anticuerpo en suero se determinaron mediante ELISA usando los péptidos recombinantes correspondientes de *P. aeruginosa* marcada con His-Tag como antígeno de recubrimiento. La producción y purificación de estos polipéptidos recombinantes de *P. aeruginosa* marcados con His-tag se presenta en el ejemplo 6.

#### EJEMPLO 6

Este ejemplo ilustra la producción y la purificación de polipéptidos recombinantes de *P. aeruginosa*.

Se usó el plásmido pET21b(+) recombinante con genes SPA-1 (SEC ID N°: 1), SPA-2 (SEC ID N°: 3) y SPA-3 (SEC ID N°: 5) para transformar por electroporación (aparato Gene Pulser II, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canadá) cepas de *E. coli* Tuner (DE3) [*F<sup>-</sup> amp<sup>r</sup> hsd<sup>S</sup><sub>B</sub> (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal dcm lacY1* (DE3)] (Novagen). En esta cepa de *E. coli*, el promotor T7 que controla la expresión del polipéptido recombinante es reconocido específicamente por la ARN-polimerasa T7 (presente en el profago  $\lambda$ DE3) cuyo gen está bajo el control del promotor lac que es inducible por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). El transformante Tuner (DE3)/rpET21 se cultivó a 37 °C con agitación a 250 rpm en medio Luria-Betani (LB) (10 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl) que contenía 100  $\mu$ g de ampicilina (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Canadá) por ml hasta alcanzar un valor de A<sub>600</sub> de 0,5. Para inducir la producción de polipéptidos recombinantes de *P. aeruginosa* marcados con His, las células se incubaron durante 3 horas adicionales en presencia de IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Las células inducidas a partir de 1 l de cultivo se sedimentaron por centrifugación y se congelaron a -70 °C.

La purificación de los polipéptidos recombinantes a partir de las fracciones citoplasmáticas solubles o insolubles de Tuner inducido por IPTG (DE3) /rpET21 se realizó por cromatografía de afinidad en base a las propiedades de la secuencia His-Tag (6 restos de histidina consecutivos) para su unión a cationes divalentes (Ni<sup>2+</sup>) inmovilizados sobre la resina de quelación de metal His-Bind. Brevemente, para la purificación de polipéptidos SPA-2 y SPA-3 a partir la fracción citoplasmática soluble, las células sedimentadas obtenidas de un cultivo de 1 l inducido con IPTG se sometieron a sonicación y se centrifugaron a 21.000 X g durante 30 min para eliminar residuos. Para la purificación de polipéptidos recombinantes SPA-1 a partir de la fracción citoplasmática insoluble, las células se sometieron a sonicación y se centrifugaron como anteriormente y el sedimento resultante se volvió a suspender en un tampón de lisis (imidazol 5 mM, NaCl 2 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,9) con Guanidina-HCl 6 M. La suspensión se incubó sobre hielo durante 1 h y se centrifugó a 39.000 x g durante 20 min. Los sobrenadantes que contenían polipéptidos SPA-2 y SPA-3 solubles o polipéptido SPA-1 solubilizado se depositaron en una columna de Ni-NTA agarosa (Qiagen). Los

polipéptidos recombinantes de *P. aeruginosa* marcados con His-tag se eluyeron con imidazol 250 mM-NaCl 500 mM-Tris 20 mM, pH 7,9. La eliminación de la sal y el imidazol de la muestra se realizó mediante diálisis contra PBS a 4 °C. Las cantidades de polipéptidos recombinantes obtenidas a partir de las fracciones soluble e insoluble de *E. coli* se estimaron por MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois).

## 5 EJEMPLO 7

Este ejemplo ilustra la reactividad de los polipéptidos recombinantes de *P. aeruginosa* marcados con His con anticuerpos presentes en suero humano.

10 Tal como se muestra en la tabla 3, los polipéptidos recombinantes SPA-1, SPA-2 y SPA-3 marcados con His fueron reconocidos en ensayos de inmunotransferencia por los anticuerpos presentes en los sueros humanos. Esto indica que los seres humanos que están normalmente en contacto con *P. aeruginosa* desarrollan anticuerpos que son específicos de estos polipéptidos. Estos anticuerpos humanos particulares pueden estar implicados en la protección contra la infección por *P. aeruginosa*.

Tabla 3. Reactividad en inmunoensayos de anticuerpos presentes en sueros humanos con polipéptidos recombinantes de fusión marcados con His de *P. aeruginosa*

Polipéptido recombinante purificado I.D. <sup>1</sup>	Peso molecular aparente (kDa) <sup>2</sup>	Reactividad en inmunoensayos con anticuerpos presentes en sueros humanos <sup>3</sup>
SPA-1	48	+
SPA-2	25	+
SPA-3	40	+

<sup>1</sup> Se usaron polipéptidos recombinantes marcados con His producidos y purificados según se describe en el ejemplo 6 para realizar las inmunotransferencias. <sup>2</sup> El peso molecular de los polipéptidos recombinantes marcados con His se estimó después de un SDS-PAGE. <sup>3</sup> Una combinación de tres sueros humanos, cada uno diluido 1/500, se preparó para realizar las inmunotransferencias.

15

## EJEMPLO 8

Este ejemplo ilustra la accesibilidad a anticuerpos de los polipéptidos SPA-1, SPA-2 y SPA-3 en la superficie de una cepa de *P. aeruginosa*.

20 Las bacterias se cultivaron durante toda la noche en agar de sangre a 30 °C. Las colonias se resuspendieron en medio LB para obtener una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,3. Se añadieron después diluciones de sueros anti-SPA-1, anti-SPA-2 o anti-SPA-3 o de control y se dejó que se unieran a las células, que se incubaron durante 2 horas a 4 °C con rotación. Las muestras se lavaron 2 veces en tampón de bloqueo (solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía el 2 % de albúmina de suero bovino (BSA)), y después se añadieron 500 µl de Fc de IgG (gamma) antirratón conjugado con fluoresceína (FITC) de cabra específico del fragmento, diluido en tampón de bloqueo. Después de una incubación adicional de 2 h a 4 °C con rotación en la oscuridad, las muestras se lavaron 2 veces en tampón de bloqueo y se fijaron con el 0,25 % de formaldehído en tampón de PBS durante 18 h a 4 °C. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de PBS. Las células se guardaron en oscuridad a 4 °C hasta que se analizaron por citometría de flujo (Epics® XL; Beckman Coulter, Inc.). El análisis de citometría de flujo reveló que los anticuerpos específicos de SPA-1, SPA-2 y SPA-3 reconocieron eficazmente sus correspondientes epítomos expuestos superficialmente sobre la cepa de *P. aeruginosa* (PAO1) homóloga analizada (Tabla 4). Se determinó que más del 55 % de las 10.000 células de *Pseudomonas* analizadas estaban marcadas con los anticuerpos presentes en los sueros específicos de SPA-1, SPA-2 y SPA-3. Estas observaciones demuestran claramente que los polipéptidos SPA-1, SPA-2 y SPA-3 son accesibles en la superficie, en la que pueden ser fácilmente reconocidos por anticuerpos. Se demostró que los anticuerpos anti-*P. aeruginosa* tienen un papel importante en la protección contra la infección por *P. aeruginosa*.

35

Tabla 4. Evaluación de la unión de anticuerpos específicos de SPA-1, SPA-2 y SPA-3 en la superficie de células intactas de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1.

Identificación de suero	Índice de fluorescencia <sup>2</sup>	% de células marcadas <sup>3</sup>
Suero específico de SPA-1 <sup>1</sup>	10,0	58
Suero específico de SPA-2	21,3	75
Suero específico de SPA-3	10,0	55
Suero de control negativo <sup>4</sup>	1,0	1,0
Suero de control positivo <sup>5</sup>	37,4	83

<sup>1</sup> Se inyectó a los ratones por vía subcutánea cuatro veces a intervalos de dos semanas 20 µg de polipéptidos recombinantes purificados mezclados con 10 µg de coadyuvante QuilA (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canadá). Los sueros se diluyeron 1/50.

<sup>2</sup> El índice de fluorescencia se calculó como la mediana del valor de la fluorescencia obtenido después de marcar las células con un suero inmunitario dividido por el valor de la fluorescencia obtenido para un suero de ratón de control. Un valor de fluorescencia de 1 indica que no existe unión de anticuerpos en la superficie de

células de *Pseudomonas* intactas.

<sup>3</sup> % de células marcadas de las 10.000 células analizadas.

<sup>4</sup> Los sueros recogidos de ratones no inmunizados e inmunizados de forma simulada se agruparon, se diluyeron 1/50 y se usaron como control negativo para este ensayo.

<sup>5</sup> El suero obtenido de un ratón inmunizado con 20 µg de polipéptido de membrana exterior recombinante purificado OprI de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 se diluyó 1/50 y se usó como control positivo para el ensayo.

## EJEMPLO 9

Este ejemplo ilustra la protección de ratones contra la infección por *P. aeruginosa* inducida por inmunización con polipéptido recombinante SPA-2.

- 5 Se inmunizaron por vía subcutánea 4 ratones BALB/c hembras (Charles River) cuatro veces a intervalos de dos semanas con 20 µg de polipéptidos recombinantes SPA-2 de *P. aeruginosa* marcados con His purificados con afinidad en presencia del 10 % de coadyuvante QuilA (Cedarlane Laboratories Ltd) o, como control, con coadyuvante de QuilA solo en PBS. Se recogieron muestras de sangre de la cavidad orbitaria los días 0, 14, 28 y 42 antes de cada inmunización y 7 días (día 49) después de la cuarta inyección. Una semana después, los ratones se sometieron a provocación por vía intratraqueal con aproximadamente  $5 \times 10^7$  de UFC de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Las muestras del inóculo de provocación de *P. aeruginosa* se plaquearon en placas de agar de sangre para determinar la CPU y para verificar la dosis de provocación. Se realizó un seguimiento de la supervivencia de los ratones en un periodo de 5 días y la protección se presentó como el porcentaje de ratones supervivientes en comparación con la supervivencia en el grupo de ratones inmunizados solo con coadyuvante. Los resultados presentados en la tabla 5 indican que la inmunización con polipéptido recombinante de SPA-2 puede retrasar la mortalidad y proteger ratones de una infección mortal por *Pseudomonas*.

Tabla 5. Protección conferida mediante inmunización con polipéptido recombinante SPA-2 contra la provocación mortal intratraqueal

Grupos <sup>1</sup>	% de supervivencia	Tiempo de supervivencia medio
SPA-2	75	108 h
QuilA	25	75 h

<sup>1</sup> Se inyectó a los ratones por vía subcutánea cuatro veces a intervalos de dos semanas 20 µg de polipéptidos recombinantes purificados mezclados con 10 µg de coadyuvante QuilA (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canadá) o coadyuvante QuilA solo como control negativo.

- 20 **Ejemplo 10.** Este ejemplo ilustra la identificación de homólogos de SPA-1 en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* que puedan usarse como inmunógenos para vacunas.

El análisis del genoma permitió la identificación de 3 genes que codifican proteínas homólogas a SPA-1. Las secuencias de cada gen y de cada proteína se presentan en las figuras 7, 9, 11 y en las figuras 8, 10, 12 respectivamente. Las proteínas SHB-PA104 (SEC ID N°: 8), SHB-PA105 (SEC ID N°: 10) y SHB-PA106 (SEC ID N°: 12) presentan una identidad del 49,4 % (más de 389 aa; Figura 13), 33,2 % (más de 361 aa; Figura 14) y 32,2 % (más de 289 aa; Figura 15) con la proteína SPA-1 (448 aa) respectivamente. Un documento que presenta las 4 proteínas homólogas se publicó en enero de 2002 (Blackburn, N.T. y Clarke, A.J. (2002) *Biochemistry*, 41: 1001-1013). El documento describe estas proteínas como una familia de transglicosilasas líticas. Debido a las homologías con SPA-1, pueden representar vacunas experimentales accesibles de interés. La tabla 6 describe cebadores para amplificar los tres genes novedosos que pueden sobreexpresarse, purificarse y usarse como para SPA-1.

Tabla 6. Cebadores oligonucleótidos para la amplificación por PCR de genes nuevos de *P. aeruginosa*

Genes	Cebadores I.D.	Sitio de restricción	Vector	Secuencia	Secuencia I.D. N°
SHB-PA104	PSEU446	<i>Nde</i> I	pET19b	5' - GAGTTCATATGA GCTTCCCTTCCTG CCTCGCCGGCCCTG CAG -3'	25
SHB-PA104	PSEU622	<i>Bam</i> HI	pET19b	5' - CGCTGAGGATCCT CACTTCTGCAATT GCTTGGCTCGAG CC -3'	26

(cont.)

SHB-PA105	PSEU442	<i>NdeI</i>	pET19b	5' - GGGAATTCCATAT GGGGGCGGCCAG GCGG CG-3'	27
SHB-PA105	PSEU443	<i>BamHI</i>	pET19b	5' - GCGCTGAGGATCC TCAATGGGCACCT CGCG -3'	28
SHB-PA106	PSEU438	<i>NdeI</i>	pET19b	5' - GGGAATTCCATAT GAGCAGCGAACCG ACGC -3'	29
SHB-PA106	PSEU638	<i>HindIII</i>	pET19b	5' - CGCCAAGCTTCTA ATCCTGCCTGACG ACGG -3'	30

**Ejemplo 11.** Este ejemplo ilustra el procedimiento usado para la extracción de lípidos a partir de células bacterianas.

Se extrajeron mezclas de lípidos complejos de *E. coli* para generar formulaciones de liposomas de origen bacteriano. Para generar dichas mezclas de lípidos complejos también habrían sido adecuadas otras especies bacterianas tales como: *Neisseria* spp, *Haemophilus* spp, *Pseudomonas* spp, *bacteriodes* spp, *Legionella* spp, *Vibrio* spp, *Brucella* spp, *Bordetella* spp, *Campylobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Proteus* spp y *Yersinia* spp. También podrían usarse otras especies. El procedimiento siguiente se usó para generar las mezclas de lípidos complejos usadas para generar las formulaciones de liposomas presentadas en el ejemplo 12.

Las bacterias se cultivaron durante toda la noche en medio BHI a 37 °C en presencia del 8 % de CO<sub>2</sub> (175 rpm). Las células se recogieron por centrifugación y el sedimento se suspendió en 6,7 ml de metanol por gramo de células (peso en húmedo). Esta suspensión bacteriana se sometió a sonicación en un baño de hielo dos veces usando un desmembrador Sonic 500 (Fisher Scientific) con una sonda de micropunta ajustada a 8. Después, esta suspensión se calentó a 65 °C durante 30 min. Después del periodo de incubación, se añadieron a la suspensión 2 volúmenes de cloroformo y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró a través de un filtro Whatman N° 4. El filtrado se transfirió a un tubo de Teflón y después se añadieron 0,2 volúmenes de solución salina (NaCl al 0,6 % (p/v)). Después de la centrifugación, la fase superior y el precipitado de la interfase se descartaron. La fase inferior se extrajo con un volumen de cloroformo:metano:solución salina (3:48:47) al menos cuatro veces o hasta que no hubo más precipitado en la interfase. Después de la extracción final, la fase orgánica inferior se secó en un evaporador rotatorio (Rotavapor, Büchi, Suiza). Los fosfolípidos secos se almacenaron a -80 °C o se resuspendieron en una solución de cloroformo:metanol (2:1).

**Ejemplo 12.** Este ejemplo ilustra la incorporación de SPA-1 recombinante a formulaciones diferentes de liposomas.

Los liposomas se prepararon usando un procedimiento de diálisis. Los liposomas se prepararon con diferentes fosfolípidos sintéticos (véase la lista 1 en este ejemplo; pueden usarse otros lípidos y se describen en Remington's on Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., 1990, Mack Publishing Co., Pennsylvania, p. 390.) o bacterianos y/o colesterol, que se combinaron en proporciones diferentes. Algunas formulaciones de liposomas se prepararon también con el coadyuvante monofosforil lípido A (MPLA, Avanti polar lipids, Alabaster, AL) a una concentración de 600 µg/ml. La proteína SPA-1 se precipitó en primer lugar en etanol al 90 % (vol/vol) y se desnaturizó en 1 ml de tampón PBS que contenía el 1 % (p/vol) de SDS (Sigma chemical) en tampón PBS y se calentó a 100 °C durante 10 min. La solución se diluyó con 1 ml de tampón PBS que contenía el 15 % (p/vol) de n-octil-D-glucopiranosido (OG, Sigma) y se incubó a temperatura ambiente durante 3 h. Los lípidos se disolvieron en una solución de cloroformo:metanol (2:1) en un matraz de fondo redondo y se secaron usando un evaporador rotatorio (Rotavapor, Buchi, Suiza) para lograr una película plana sobre el recipiente. La solución de proteína-detergente anterior se añadió después a la película de lípidos y se mezcló cuidadosamente hasta que la película se disolvió. La solución después del mezclado era ligeramente opalescente en apariencia. La solución se sometió después a diálisis extensamente contra el tampón PBS (pH 7,4) para eliminar el detergente y para inducir la formación de liposomas. Después de la diálisis, la solución lechosa resultante se extruyó secuencialmente a través de filtros de policarbonato de 1000, 400, 200 y 100 nm usando un dispositivo de extrusión de acero inoxidable (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canadá). Las proteínas no encapsuladas se eliminaron por ultracentrifugación a 250.000 x g durante 1 h a 4 °C. El sedimento se suspendió con tampón PBS que contenía una concentración 0,3 M de sacarosa. El tamaño de las vesículas y la homogeneidad se evaluaron por dispersión de la luz cuasielástica (modelo N4 Plus, Beckman Coulter). Usando este aparato, se estimó que el tamaño de los liposomas en las diferentes preparaciones era aproximadamente de 100

nm. Todas las preparaciones de liposomas se esterilizaron mediante filtración a través de una membrana de 0,22- $\mu\text{m}$  y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La cantidad de proteína recombinante incorporada en el liposoma se estimó mediante MicroBCA (Pierce, Rockford, I11.) después de la extracción de fosfolípidos de las preparaciones de liposomas SPA-1 con solución de cloroformo:metanol (2:1) tal como se describe por Wessel y Flügge (Anal. Biochem. 1984, 138:141-143).

La filtración en gel se usó como un procedimiento alternativo para inducir la formación de liposoma SPA-1 a partir de una solución de micelas mixta de SPA-1-lípidos OGSDS y para eliminar detergentes. La solución de SPA-1-lípidos OG-SDS se aplicó directamente a la parte superior de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño/desalación Sephadex G-50 (tamaño de columna: 2 x 20 cm, Pharmacia) o una P-6 (tamaño de columna: 2 x 20 cm, Bio Rad) y se eluyó con tampón PBS a una velocidad de flujo de 2,5 ml/min. Las fracciones que contenían tanto proteína como lípidos se agruparon, extrudieron, centrifugaron y los tamaños de vesícula se evaluaron tal como se ha descrito anteriormente. Todas las preparaciones se esterilizaron a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Lista 1. Lista parcial de lípidos sintéticos usados para preparar preparaciones de liposomas SPA-1.

- 15 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfato (DLPA), dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfato (DMPA), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato (DPPA), 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfato (DSPA), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfato (DOPA), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfato (POPA), 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-ditridecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dipentadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diheptadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dimiristoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1-miristoil-2-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1-miristoil-2-estearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-miristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-estearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DLPE), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-dipalmitoleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPB), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-[fosfo-RAC-(1-glicerol)] (DLPG), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-RAC-(1-glicerol)] (DMPG), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-RAC-(1-glicerol)] (DPPG), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-RAC-(1-glicerol)] (DSPG), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-RAC-(1-glicerol)] (DOPG), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-RAC-(1-glicerol)] (POPG), 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-[fosfo-L-serina] (DLPS), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-L-serina] (DMPS), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-L-serina] (DPPS), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-L-serina] (DSPS), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-L-serina] (DOPS), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-L-serina] (POPS).

**Ejemplo 13.** Este ejemplo ilustra la inmunización de ratones y conejos con formulaciones de liposoma SPA-1.

Grupos de ratones BALB/c hembras (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canadá) se inmunizaron por vía intramuscular (IM) cuatro veces a intervalos de dos semanas con 20  $\mu\text{g}$  de SPA-1 recombinante incorporado a preparaciones de liposomas diferentes o, como control, con formulaciones de liposomas exentas de proteína. Se recogieron muestras de sangre de la cavidad orbitaria antes de cada inmunización y dos semanas después de la última inyección. Las muestras de suero se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se inmunizaron conejos hembra blancos de Nueva Zelanda (2,5 kg, Charles River) IM tres o cuatro veces en intervalos de tres semanas en varios sitios con 100  $\mu\text{g}$  de proteína de SPA-1 recombinante incorporada a diferentes formulaciones de liposomas. Se recogieron muestras de suero antes de cada inmunización y tres semanas después de la última inyección. Las muestras de suero se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La solicitud divulga las realizaciones siguientes

1. Un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido seleccionado de:

- 45 (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 70 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 80 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- 50 (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- 55

- (e) un polinucleótido que codifica un polipéptido capaz de obtener anticuerpos que tengan especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- 5 (f) un polinucleótido que codifica un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- (g) un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o fragmentos o análogos del mismo;
- (h) un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido de (a), (b), (c), (d), (e), (f) o (g).
2. Un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido seleccionado de:
- 10 (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 70 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 80 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- 15 (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- (e) un polinucleótido que codifica un polipéptido capaz de obtener anticuerpos que tengan especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de: SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- 20 (f) un polinucleótido que codifica un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- (g) un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 1; 3; 5; 7; 9 o 11;
- (h) un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido de (a), (b), (c), (d), (e), (f) o (g).
3. El polinucleótido del punto 1, siendo dicho polinucleótido ADN.
- 25 4. El polinucleótido del punto 2, siendo dicho polinucleótido ADN.
5. El polinucleótido del punto 1, siendo dicho polinucleótido ARN.
6. El polinucleótido del punto 2, siendo dicho polinucleótido ARN.
7. Un polinucleótido aislado que se hibrida en condiciones restrictivas a bien
- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien
- 30 (b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
8. El polinucleótido del punto 1 que se hibrida en condiciones restrictivas a bien
- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien
- 35 (b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
9. El polinucleótido del punto 2 que se hibrida en condiciones restrictivas a bien
- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien
- (b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10 o 12.
- 40 10. El polinucleótido del punto 1 que se hibrida en condiciones restrictivas a bien
- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien
- (b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido al menos 10 restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las

SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;

11. El polinucleótido del punto 2 que se hibrida en condiciones restrictivas a bien
- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o bien
- 5 (b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido al menos 10 restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10 o 12.
12. Un polinucleótido aislado que tiene una secuencia que comprende las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o fragmentos o análogos del mismo.
13. Un polinucleótido aislado que tiene una secuencia que comprende las SEC ID N°: 1; 3; 5; 7; 9 o 11.
- 10 14. Un vector que comprende el polinucleótido del punto 1, estando dicho polinucleótido unido operativamente a una región de control de la expresión.
15. Un vector que comprende el polinucleótido del punto 2, estando dicho polinucleótido unido operativamente a una región de control de la expresión.
16. Una célula huésped transfectada con el vector del punto 14.
- 15 17. Una célula huésped transfectada con el vector del punto 15.
18. Un procedimiento para producir un polipéptido que comprende cultivar una célula huésped según el punto 16 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido.
19. Un procedimiento para producir un polipéptido que comprende cultivar una célula huésped según el punto 17 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido.
- 20 20. Un polipéptido aislado que comprende un polipéptido seleccionado de:
- (a) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 70 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- (b) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 80 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- 25 (c) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- (d) un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- 30 (e) un polipéptido capaz de obtener anticuerpos que tengan especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- (f) un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo;
- (g) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que el resto de Met N-terminal está eliminado;
- (h) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que la secuencia de aminoácidos secretora está eliminada.
- 35 21. Un polipéptido aislado que comprende un polipéptido seleccionado de:
- (a) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 70 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- (b) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 80 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- 40 (c) un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 95 % con un segundo polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- (d) un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;
- (e) un polipéptido capaz de obtener anticuerpos que tengan especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;

(f) un epítipo que porta una porción de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2; 4; 6; 8; 10 o 12;

(g) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que el resto de Met N-terminal está eliminado.

22. El polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que la secuencia de aminoácidos secretora está eliminada.

5 23. Un polipéptido quimérico que comprende dos o más polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o fragmentos o análogos del mismo, siempre que los polipéptidos estén unidos de modo que formen un polipéptido quimérico.

10 24. Un polipéptido quimérico que comprende dos o más polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, siempre que los polipéptidos estén unidos de modo que formen un polipéptido quimérico.

25. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según uno cualquiera de los puntos 20 a 24 y un vehículo, diluyente o coadyuvante farmacéuticamente aceptable.

26. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según uno cualquiera de los puntos 20 a 24 y un liposoma.

15 27. Un procedimiento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de infección bacteriana por Pseudomonas aeruginosa en un huésped susceptible a la infección por Pseudomonas aeruginosa que comprende administrar a dicho huésped una cantidad terapéutica o profiláctica de una composición según el punto 25.

20 28. Un procedimiento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de neumonía, bacteremia, infección crónica o septicemia en un huésped susceptible a la infección por Pseudomonas aeruginosa que comprende administrar a dicho huésped una cantidad terapéutica o profiláctica de una composición según el punto 25.

29. Un procedimiento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de neumonía, bacteremia, infección crónica o septicemia en un huésped susceptible a la infección por Pseudomonas aeruginosa que comprende administrar a dicho huésped una cantidad terapéutica o profiláctica de una composición según el punto 26.

25 30. Un procedimiento para diagnosticar infección por Pseudomonas en un huésped susceptible a infección por Pseudomonas que comprende

(a) obtener una muestra biológica de un huésped;

(b) incubar un anticuerpo o fragmento del mismo reactivo con un polipéptido por Pseudomonas de la invención con la muestra biológica para formar una mezcla; y

30 (c) detectar el anticuerpo unido o el fragmento unido específicamente en la mezcla que indica la presencia de Pseudomonas.

31. Un procedimiento para diagnosticar infección por Pseudomonas en un huésped susceptible a infección por Pseudomonas que comprende

(a) obtener una muestra biológica de un huésped;

35 (b) incubar uno o más polipéptidos de Pseudomonas de la invención o fragmentos de los mismos con la muestra biológica para formar una mezcla; y

(c) detectar el anticuerpo unido o el fragmento unido específicamente en la mezcla que indica la presencia de anticuerpo específico de Pseudomonas.

32. Un procedimiento para el tratamiento de infección por Pseudomonas usando un anticuerpo dirigido a un polipéptido según una cualquiera de los puntos 20 a 24.

40 33. Uso de la composición farmacéutica según el punto 25 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por Pseudomonas.

34. Uso de la composición farmacéutica según el punto 26 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por Pseudomonas.

45 35. Kit que comprende un polipéptido según uno cualquiera de los puntos 20 a 24 para la detección o diagnóstico de infección por Pseudomonas.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ID Biomedical Corporation

# ES 2 431 318 T3

<120> Polipéptidos de Pseudomonas Aeruginosa

<130> K1952 EP/1

5 <140> PCT/CA02/01740

<141> 13-11-2002

<150> US 60/331.221

<151> 13-11-2001

10 <160> 36

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1347

15 <212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 1

```
.atgcgtaacc ccgaacgata cgccctgctg aaggtgagcg ggctgctggg cagcaccgtc      60
gtcgccatgg ggcttggcct ctccagcgcc tgcgcgaga agaatccgac agtcgaatac      120
aaccagcctg ccgctcccc gcagaccaag gcgcccttct ccggcgccgg cccggccgcc      180
tcggtgcccg ctggcgcgcc gaacgaggcc cagcctgggc aaagcttcga acagtggcgc      240
gacgccttcc gtcaacaggc gctggccggt ggaatcgatg cgcagacctt cgatcgcgcc      300
ttcgccggcg tccagcccga tcccgccgtg gtcgaagcag accgcagcca gccggaattc      360
acccgaccgg tatggaagta cctggaaggc gccctcgatc cgctgcgcg tccagggc      420
caggcgcgcc tggcgagca tgcgcgcatc ctcggcgaag tcgacgcgcg ctatgcggtg      480
gatgcggatg cgggtggtggc gatctggggc atggagagca actacggttc gcacatgggc      540
aacaagaacg tgatccgctc cctggcgacc ctcgcctatg aaggacgccg cccggaattc      600
gcccacgccc agttgctcgc cgccctgaag attctccagc acggcgacgt tccggcctcc      660
```

ES 2 431 318 T3

ttcatgatcg gctcctgggc cggcgccatg ggccagacc agttcatccc gaccaccac 720  
aaccagtatg ccgtggactt cgacggcgac ggcaagcgtg acatctgggg ctgccccggc 780  
gacgccctgg cctccaccgc caactacctg aaagcctccg gctggatcgc cggacaaccc 840  
tggggtttcg aagtccgcct gccggcaggc ttcgactatt ccctggcggg actcaccatc 900  
cgcaagcccc tgggcgaatg gcaagggatg ggcgtacaag gcgtcaacgg cggccccctg 960  
ccctccggac tctccggcga acaggcctcg ctgctgctgc cggccgggca ccgcgccccg 1020  
gccttcttgg tgctgcacaa cttccgcgcc atcctcaagt acaacaactc cagcgcctac 1080  
gccctggccg tcggcctgct cggcgacagc ttcaagggcg gcggccggat agtcggcgcc 1140  
tggccgctgg aggatgttcc gctgagccgc tcgcagcga tcgagctgca acggcaactg 1200  
gccgccccgc gacacgatcc gggcgcggtg gatggcatca tcggcgcaa tacgcgcaag 1260  
gcgatccgcg cctgccagca ggagtccggc tggccggcgg acggctatcc gaccccggcg 1320  
ctgctcgacc gcctgctggac gccatag 1347

<210> 2

<211> 448

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 2

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

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

Ala Ala Arg Gly His Asp Pro Gly Ala Val Asp Gly Ile Ile Gly Ala  
 405 410 415

Asn Thr Arg Lys Ala Ile Arg Ala Cys Gln Gln Glu Phe Gly Trp Pro  
 420 425 430

Ala Asp Gly Tyr Pro Thr Pro Ala Leu Leu Asp Arg Leu Arg Thr Pro  
 435 440 445

<210> 3

<211> 624

<212> ADN

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 3

atgaaacgta tcctgaccag cgccgcgctg atcggatga ccaccctgct ggccgcctgc 60  
 ggcttccaac tgcgcggcct gggcgatgcg caattcgcgc tcaaggaaat cgacgtgtcc 120  
 gcgcgcaacg cctacggccc gaccgtgctg gaactgaagg aaaccctgga aaacagcggc 180  
 gtgaagggtca ccagcaacgc gccctaccac ctggtgctgg tccgcgagga caaccagcag 240  
 cgcaccgtca gctacaccgg ttccgcgcgc ggcgcggagt tcgagctgac caacacgatc 300  
 aactacgaga tcgtcggcgc caacgacctg gtcctgatga gcaaccaggt acaggtgcag 360  
 aaggtctacg tgcacgacga aaacaacctg atcggttccg accaggaagc cgcgagctg 420  
 cgcagcgaga tgcggcgcga cctgatccag cagttgtcca tgcgcctcca ggcgctgacc 480  
 ccggcgcaac tcgacgaagc ccagcgccag gcagaagcca aggccaaggc ggaagccgaa 540  
 gccctgctgcg ccgccgacga ggcggagcgc cagcgccgcg ccgccgagcc gcagcagtcg 600  
 ccgatcgagt tccccacccc gtga 624

<210> 4

10 <211> 207

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 4

Met Lys Arg Ile Leu Thr Ser Ala Ala Leu Ile Gly Met Thr Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Ala Cys Gly Phe Gln Leu Arg Gly Leu Gly Asp Ala Gln Phe  
 20 25 30

15

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

<210> 5

<211> 1143

<212> ADN

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 5

atggtgcaat ggaaacacgc ggcgctgctc gccctggccc tggcggtcgt gggttgcagc 60  
 agcaacagca agaaggaact cccgcccgcc gaactgaccg acttcaaaga ggaagtcgtg 120  
 ttgagcaagc agtggagccg ctcggtcggg gatggtcagg gcgacctgta caacctgctc 180  
 gaaccggccg tcgatggttc caccatctac gccgcgtccg ccgaagggcg ggtgatggcg 240  
 atccagcgcg agaccggcga cgtgctctgg aagaaggacc tggaacgtcc ggtttccggc 300  
 ggtgtcggcg ttggctacgg cctggtgctg gtgggtaccc tgcgcggtga cgtgatcgcc 360  
 ctcgacgaag ccaccggcaa gaagaagtgg accaagcgag tcaacagcga agtgctgtcg 420

ES 2 431 318 T3

gcgccggcca ccaatggcga cgtggtggtg gtgcagaccc aggacgacaa gctgatcggc 480  
ctcgatgcgg ccagcggcga ccagcgtggt atctacgaaa gcaccgtgcc ggtgctgacc 540  
ctgcgcggca ccggcgcgcc gctgattgcc ggcaacatgg ccctggctgg cctggccagc 600  
ggcaaggtag tggcggtcga cgtacagcgc ggcctgccga tctgggagca gcgggtagcg 660  
attccccagg ggcgttccga actggatcgc gtggtggaca tcgacggcgg cctcctgctg 720  
tccggcgaca ccctctacgt ggtcagctac cagggccgtg ccgcggcgct ggacgtgaac 780  
agcggccgcc tgctctggca gcgcgaagcg tcgagctacg tcggcgtcgc cgaaggcttc 840  
ggcaatatct acgtcagcca ggccagcggg tcggtggaag gcctggactc gcgcggcgct 900  
tcttcgctgt ggaacaacga cgcctggcg cgtcgccaac tgctggctcc ggcggtgttc 960  
tccagcaacg tgggtggtcgg cgacctgga ggctacgtgc acctgctgag ccagggtggac 1020  
ggtcgcttcg tcggtcgcga gcgggtcgac agcgtggcg tcggggttcg tccgctggtg 1080  
gtcgggagct ggatgtacgt gttcggcaac ggtggcaagc tcgtcgcta caccatccgc 1140  
tag 1143

<210> 6

<211> 380

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6

Met Val Gln Trp Lys His Ala Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val  
1 5 10 15  
Val Gly Cys Ser Ser Asn Ser Lys Lys Glu Leu Pro Pro Ala Glu Leu  
20 25 30  
Thr Asp Phe Lys Glu Glu Val Val Leu Ser Lys Gln Trp Ser Arg Ser  
35 40 45  
Val Gly Asp Gly Gln Gly Asp Leu Tyr Asn Leu Leu Glu Pro Ala Val  
50 55 60  
Asp Gly Ser Thr Ile Tyr Ala Ala Ser Ala Glu Gly Arg Val Met Ala  
65 70 75 80  
Ile Gln Arg Glu Thr Gly Asp Val Leu Trp Lys Lys Asp Leu Glu Arg  
85 90 95  
Pro Val Ser Gly Gly Val Gly Val Gly Tyr Gly Leu Val Leu Val Gly  
100 105 110

ES 2 431 318 T3

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

<210> 7

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia de cebador

<400> 7

10 ggaattcca tatggcgag aagaatccga cagtcg 36

<210> 8

<211> 33

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

20 <400> 8

ataagaatgc ggccgctggc gtccgcaggc ggt 33

<210> 9

<211> 30

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

30

<400> 9

gggcagatct tgatggcgca gaagaatccg 30

<210> 10

35 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

<400> 10

5 gatcctctag attggcgtcc gcaggcggtc 30

<210> 11

<211> 31

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

15 <400> 11

gggaattcca tatgggcttc caactgcgcg g 31

<210> 12

<211> 28

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

25

<400> 12

cgccaagctt cgggggtggg aactcgat 28

<210> 13

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> secuencia de cebador

<400> 13

# ES 2 431 318 T3

cgaggatcct atgtgCGGct tccaactgCG 30

<210> 14

<211> 31

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

10

<400> 14

cagaagcttc ggggtgggga actCGatCGg c 31

<210> 15

15 <211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> secuencia de cebador

<400> 15

gggaattcca tatgagcagc aacagcaaga aggaactc 38

25 <210> 16

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> secuencia de cebador

<400> 16

cgccaagctt gCGgatggtg taggCGac 28

35

<210> 17

<211> 30

ES 2 431 318 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de cebador

<400> 17

cgaggatcct atgagcaaga aggaactccc 30

10 <210> 18

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia de cebador

<400> 18

cagaagcttc tagcggattg gtgtaggcga c 31

20

<210> 19

<211> 1197

<212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

25

<400> 19

atg	cg	cag	cc	ttctt	ctc	ctc	gct	gg	cc	ct	g	g	cc	ct	gg	cg	ca	acc	cc	60													
gac	gc	cct	cg	a	g	ctt	cc	ctt	c	ct	gc	ct	cg	cc	gg	cc	tg	ca	ga	aga	agg	ccc	ca	gg	cg	agg	gc	120					
att	tcc	gcc	cg	a	cag	tt	at	ga	g	cg	ctt	c	acc	a	gc	gg	cct	gc	agg	cc	g	ac	ct	c	ag	cg	t	g	ctc	180			
gac	ct	g	ct	cg	tc	g	ac	gc	gc	ag	cc	g	ag	cc	g	ct	gt	g	gg	ac	ta	cc	ct	gg	cc	gg	cc	ct	g	240			
gt	gg	ac	g	ag	c	ag	g	g	tc	ag	c	g	at	gg	ca	ag	g	cg	at	g	ct	cg	ccc	ag	ca	cg	aa	g	ct	g	ctc	300	
gac	ca	g	g	t	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	360	
gaa	ag	cg	act	ac	gg	g	cg	gat	ctt	cg	ca	ag	cg	t	gc	cc	g	ct	gc	t	g	ac	ct	cg	ct	g	tc	g	ac	cc	ct	g	420
tc	ct	g	ct	ac	g	gc	g	cc	g	cca	g	tc	g	tt	ctt	c	ag	gg	cg	ag	t	tc	ct	g	cc	ac	c	ct	ga	ag	ct	g	480
tt	g	ca	gg	cc	g	gc	ga	cat	cc	g	gc	ac	g	cc	gg	c	at	ca	cc	gg	ct	c	ct	gg	g	cc	gg	g	gc	ctt	cg	gc	540

ES 2 431 318 T3

catacccagt tcatgccatc gacctacgcg cggatcgccg tggacttcga cggcgacggt 600  
 cgccgcgacc tggtaggcag cgtgccggat gccctcgggt ccaccgcaa ctacctgaag 660  
 aaggctggct ggcgcacggg acagccgtgg ggctatgaag tgaagggtgcc ggccgacttc 720  
 cccgccagcc tggccgggcg cggcaagcgc cagccgctgt cggcctgggt cgcccgtggg 780  
 gtgaggcggg tcgacggcca gccgctgccg ggcggcgacg agaaggccgc gatcctcctg 840  
 ccggccgggg cccagggccc ggccttcctg gtctatcgca actacgatgc gatctattcc 900  
 tacaacgccg cggaaagcta cgcgctggcc atcgccctgc tttccgaccg cctgcgcggc 960  
 ggcagcggcc tgggtggcgtc ctggccgacc gacgaccgg gcatcagccg gctcgagcgc 1020  
 aagcaattgc agaaggcgtt gctggcgcgc ggctacgaca tcggcgaggc cgacgggctg 1080  
 atcggcacca gcacgcgcaa ggcgatccag gccgagcaga agcgcctcgg cctgaccccg 1140  
 gccgacggtc ggcggggcg caagatcctc gaggcgctga agggcgccca gccctga 1197

<210> 20

<211> 398

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 20

Met Arg Ser Leu Leu Leu Ser Ser Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ser Ser Phe Pro Ser Cys Leu Ala Gly Leu  
 20 25 30  
 Gln Lys Lys Ala Gln Ala Gln Gly Ile Ser Ala Asp Ser Tyr Glu Arg  
 35 40 45  
 Phe Thr Ser Gly Leu Gln Ala Asp Leu Ser Val Leu Asp Leu Leu Asp  
 50 55 60  
 Ala Gln Pro Glu Phe Thr Thr Pro Leu Trp Asp Tyr Leu Ala Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Val Asp Glu Gln Arg Val Ser Asp Gly Lys Ala Met Leu Ala Gln His  
 85 90 95  
 Asp Lys Leu Leu Asp Gln Val Ala Ala Arg Tyr Gly Val Asp Lys Tyr  
 100 105 110

ES 2 431 318 T3

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

ES 2 431 318 T3

<210> 21

<211> 1023

<212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

5

<400> 21

```

gtgaagaacg caatgcaagt actgcgtaga tgggcggcca ggggcgtcca atgggtcggc      60
gtagccggcg tcattggcct gtccggggcg gccagggcg gggactacga cggctcgccg      120
caagtggccg agttcgtagc cgaatgacc cgcgactacg gcttcgccgg agagcagctg      180
atggggctgt tccgtagcgt gaaccgcaag cagtcgatcc tcgatgcatc ctgcgccccg      240
gccgagcggg tcaagcagtg gaaggaatac cggccgatct tcatcagcga cgcgtagcgc      300
agtcgtggcg tcgacttctg gaacaagcat gccgaagacc tggcgcgggc ggagaaggaa      360
tacggcgtgc cggccgagat catcgtctcg atcatcggcg tggaaacctt cttcggccgc      420
aacaccggca gttaccgggt gatggacgcg ctgtccaccc tcggcttcga ctaccgcccg      480
cgggcccgact tcttccgcaa ggagttgtag gagttcctcc tgctcgcccg cgaacagcag      540

gtcgacccgc tcagcctgac cggctcctac gccggcgcca tgggcctgcc acaattcatg      600
ccgagcagct tccgtagcct cgcggtggac ttcgacggcg atggccacat caatatctgg      660
agcgacccga ccgatgccat cggtagcgtc gccagctact tcaagcagca cggctgggtc      720
accggcgagc cgggtggtctc ggtggccgag atcaacgacg agagcggcca gagcgcggtg      780
accaggggcg tcgacccgac catgagcctg ggcgagctgc gtgcccgcgg ctggcgcacc      840
cacgatgtagc tgcgtagcga ccagaaggta acggcagatg gtttcgtagc cgacaagggc      900
atcgagtatt gggtcggttt gccgaacttc tacgtgatca cccgctataa tcgtagcggc      960
atgtatgcca tggcggttta tcagctggcg ggcgagattg cccgtagcgc aggtgcccac     1020
tga                                                                                   1023

```

<210> 22

10 <211> 340

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 22

Met Lys Asn Ala Met Gln Val Leu Arg Thr Trp Ala Ala Arg Gly Val  
 1 5 10 15

Gln Trp Val Gly Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Gly Ala Ala Gln  
 20 25 30

Ala Gly Asp Tyr Asp Gly Ser Pro Gln Val Ala Glu Phe Val Ser Glu  
 35 40 45

Met Thr Arg Asp Tyr Gly Phe Ala Gly Glu Gln Leu Met Gly Leu Phe  
 50 55 60

Arg Asp Val Asn Arg Lys Gln Ser Ile Leu Asp Ala Ile Ser Arg Pro  
 65 70 75 80

Ala Glu Arg Val Lys Gln Trp Lys Glu Tyr Arg Pro Ile Phe Ile Ser  
 85 90 95

Asp Ala Arg Ile Ser Arg Gly Val Asp Phe Trp Asn Lys His Ala Glu  
 100 105 110

Asp Leu Ala Arg Ala Glu Lys Glu Tyr Gly Val Pro Ala Glu Ile Ile  
 115 120 125

Val Ser Ile Ile Gly Val Glu Thr Phe Phe Gly Arg Asn Thr Gly Ser  
 130 135 140

Tyr Arg Val Met Asp Ala Leu Ser Thr Leu Gly Phe Asp Tyr Pro Pro  
 145 150 155 160

Arg Ala Asp Phe Phe Arg Lys Glu Leu Arg Glu Phe Leu Leu Leu Ala  
 165 170 175

Arg Glu Gln Gln Val Asp Pro Leu Ser Leu Thr Gly Ser Tyr Ala Gly  
 180 185 190

Ala Met Gly Leu Pro Gln Phe Met Pro Ser Ser Phe Arg Ala Tyr Ala  
 195 200 205

Val Asp Phe Asp Gly Asp Gly His Ile Asn Ile Trp Ser Asp Pro Thr  
 210 215 220

Asp Ala Ile Gly Ser Val Ala Ser Tyr Phe Lys Gln His Gly Trp Val  
 225 230 235 240

Thr Gly Glu Pro Val Val Ser Val Ala Glu Ile Asn Asp Glu Ser Ala  
 245 250 255

ES 2 431 318 T3

Glu Ser Ala Val Thr Arg Gly Val Asp Pro Thr Met Ser Leu Gly Glu  
 260 265 270

Leu Arg Ala Arg Gly Trp Arg Thr His Asp Ala Leu Arg Asp Asp Gln  
 275 280 285

Lys Val Thr Ala Met Arg Phe Val Gly Asp Lys Gly Ile Glu Tyr Trp  
 290 295 300

Val Gly Leu Pro Asn Phe Tyr Val Ile Thr Arg Tyr Asn Arg Ser Ala  
 305 310 315 320

Met Tyr Ala Met Ala Val Tyr Gln Leu Ala Gly Glu Ile Ala Arg Ala  
 325 330 335

Arg Gly Ala His  
 340

<210> 23

<211> 1104

<212> ADN

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 23

atgcgccgta ccgccctcgc cctgcccctg ttccttctgg tctcagcatg cagcagcgaa 60  
 ccgagccac caccgaaacc cgccgcaaaa ccccaggccc gcaccgtcat ttcaccccgc 120  
 cccgtacgcc agtcggtgca accgatactg ccgctgcgcg gcgattacgc gaacaatccg 180

gcggcacagc acttcatcga caggatggtc agccagcacg gcttcaaccg ccagcaactg 240  
 cacgatctgt tcgcccagac ccagcgcctg gactgggtga tccgcctgat ggaccggcaa 300  
 gccccgacct atacccacc cagcggaccg aacggcgcct ggctgcgcta ccggaagaag 360  
 ttcgtcacgc caggcaacgt acagaacggc gtgctgttct gggaccaata cgaaaccgac 420  
 ctgcaacggg catcgcgcgt ctacggcgtg ccgccggaga tcatcgtcgg catcatcggc 480  
 gtggaaacc gctgggggcg tgtgatggc aagacgcgga tcatcgtatg gctgtccacc 540  
 ctgtccttct cctaccctcg ccgcgcgga ttcttcagcg gcgaactgga gcaattcctc 600  
 ctccaggcgc gcaaggaagg caccgaccg ctggccctgc gcggttcta tgccggcgcc 660  
 atgggctacg gccagttcat gccgtcttca ttcaccaagt acgcggtgga cttcgtatggc 720

ES 2 431 318 T3

gatgggcata tcgacctgtg gaatccgcgt gacgccatcg gcagcgtcgc caactatttc 780  
aagcagcacg gctgggtcag cggcgatcgc gtggcggttc ccgccagtgg ccgggctccc 840  
tcgctggaag atggcttcaa gacgctgtac ccgctggacg tgctcgcttc cgccggatta 900  
cgcccgcagg gtccgctcgg cggccaccgg caagccagcc tgctgcgcct ggacatgggc 960  
aggaactacc agtactggta cggcctgccg aacttctacg tgatcaccgg ctataaccac 1020  
agcaccact acgcgatggc cgtctgggaa ctgggcaagg aagtcgaccg ggtgcgtcac 1080  
cgctccgtcg tcaggcagga ttag 1104

<210> 24

<211> 367

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 24

Met Arg Arg Thr Ala Leu Ala Leu Pro Leu Phe Leu Leu Val Ser Ala  
1 5 10 15

Cys Ser Ser Glu Pro Thr Pro Pro Pro Lys Pro Ala Ala Lys Pro Gln  
20 25 30

Ala Arg Thr Val Ile Ser Pro Arg Pro Val Arg Gln Ser Val Gln Pro  
35 40 45

Ile Leu Pro Leu Arg Gly Asp Tyr Ala Asn Asn Pro Ala Ala Gln His  
50 55 60

Phe Ile Asp Arg Met Val Ser Gln His Gly Phe Asn Arg Gln Gln Leu  
65 70 75 80

His Asp Leu Phe Ala Gln Thr Gln Arg Leu Asp Trp Val Ile Arg Leu  
85 90 95

Met Asp Arg Gln Ala Pro Thr Tyr Thr Pro Pro Ser Gly Pro Asn Gly  
100 105 110

Ala Trp Leu Arg Tyr Arg Lys Lys Phe Val Thr Pro Gly Asn Val Gln  
115 120 125

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

ES 2 431 318 T3

Ser Arg Val Tyr Gly Val Pro Pro Glu Ile Ile Val Gly Ile Ile Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Thr Arg Trp Gly Arg Val Met Gly Lys Thr Arg Ile Ile Asp  
 165 170 175

Ala Leu Ser Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Arg Ala Glu Phe Phe  
 180 185 190

Ser Gly Glu Leu Glu Gln Phe Leu Leu Gln Ala Arg Lys Glu Gly Thr  
 195 200 205

Asp Pro Leu Ala Leu Arg Gly Ser Tyr Ala Gly Ala Met Gly Tyr Gly  
 210 215 220

Gln Phe Met Pro Ser Ser Phe Thr Lys Tyr Ala Val Asp Phe Asp Gly  
 225 230 235 240

Asp Gly His Ile Asp Leu Trp Asn Pro Arg Asp Ala Ile Gly Ser Val  
 245 250 255

Ala Asn Tyr Phe Lys Gln His Gly Trp Val Ser Gly Asp Arg Val Ala  
 260 265 270

Val Pro Ala Ser Gly Arg Ala Pro Ser Leu Glu Asp Gly Phe Lys Thr  
 275 280 285

Leu Tyr Pro Leu Asp Val Leu Ala Ser Ala Gly Leu Arg Pro Gln Gly  
 290 295 300

Pro Leu Gly Gly His Arg Gln Ala Ser Leu Leu Arg Leu Asp Met Gly  
 305 310 315 320

Arg Asn Tyr Gln Tyr Trp Tyr Gly Leu Pro Asn Phe Tyr Val Ile Thr  
 325 330 335

Arg Tyr Asn His Ser Thr His Tyr Ala Met Ala Val Trp Glu Leu Gly  
 340 345 350

Lys Glu Val Asp Arg Val Arg His Arg Ser Val Val Arg Gln Asp  
 355 360 365

<210> 25

<211> 42

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

# ES 2 431 318 T3

<400> 25

gagttccata tgagcttccc ttctgcctc gccggcctgc ag 42

<210> 26

5 <211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de cebador

<400> 26

cgctgaggat cctcactct gcaattgctt gcgctcgagc c 41

15 <210> 27

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia de cebador

<400> 27

gggaattcca tatgggggcg gccagggcg cg 32

25

<210> 28

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> secuencia de cebador

<400> 28

gcgctgagga ttctcaatgg gcacctcgcg 30

35

<210> 29

<211> 30

ES 2 431 318 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de cebador

<400> 29

gggaattcca tatgagcagc gaaccgacgc 30

10 <210> 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia de cebador

<400> 30 .

cgccaagctt ctaatcctgc ctgacgacgg 30

20

<210> 31

<211> 419

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

25

<400> 31

Ala Cys Ala Gln Lys Asn Pro Thr Val Glu Tyr Asn Gln Pro Ala Ala  
1 5 10 15

Pro Leu Gln Thr Lys Ala Pro Phe Ser Gly Ala Gly Pro Ala Ala Ser  
20 25 30

Val Pro Ala Gly Ala Pro Asn Glu Ala Gln Pro Gly Gln Ser Phe Glu  
35 40 45

Gln Trp Arg Asp Ala Phe Arg Gln Gln Ala Leu Ala Gly Gly Ile Asp  
50 55 60

Ala Gln Thr Phe Asp Arg Ala Phe Ala Gly Val Gln Pro Asp Pro Ala  
65 70 75 80

Val Val Glu Ala Asp Arg Ser Gln Pro Glu Phe Thr Arg Pro Val Trp  
85 90 95

Lys Tyr Leu Glu Gly Ala Leu Asp Pro Leu Arg Val Arg Gln Gly Gln  
100 105 110

Ala Arg Leu Ala Gln His Ala Arg Ile Leu Gly Glu Val Asp Ala Arg  
115 120 125

Tyr Ala Val Asp Ala Asp Ala Val Val Ala Ile Trp Gly Met Glu Ser  
130 135 140

Asn Tyr Gly Ser His Met Gly Asn Lys Asn Val Ile Arg Ser Leu Ala  
145 150 155 160

Thr Leu Ala Tyr Glu Gly Arg Arg Pro Glu Phe Ala His Ala Gln Leu  
165 170 175

Leu Ala Ala Leu Lys Ile Leu Gln His Gly Asp Val Pro Ala Ser Phe  
180 185 190

Met Ile Gly Ser Trp Ala Gly Ala Met Gly Gln Thr Gln Phe Ile Pro  
195 200 205

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

Asp Ile Trp Gly Ser Pro Gly Asp Ala Leu Ala Ser Thr Ala Asn Tyr  
225 230 235 240

Leu Lys Ala Ser Gly Trp Ile Ala Gly Gln Pro Trp Gly Phe Glu Val  
245 250 255

Arg Leu Pro Ala Gly Phe Asp Tyr Ser Leu Ala Glu Leu Thr Ile Arg  
260 265 270

Lys Pro Leu Gly Glu Trp Gln Gly Met Gly Val Gln Gly Val Asn Gly  
275 280 285

Gly Pro Leu Pro Ser Gly Leu Ser Gly Glu Gln Ala Ser Leu Leu Leu  
290 295 300

Pro Ala Gly His Arg Gly Pro Ala Phe Leu Val Leu His Asn Phe Arg  
305 310 315 320

Ala Ile Leu Lys Tyr Asn Asn Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Ala Val Gly  
325 330 335

ES 2 431 318 T3

Leu Leu Ala Asp Ser Phe Lys Gly Gly Gly Arg Ile Val Gly Ala Trp  
 340 345 350

Pro Leu Glu Asp Val Pro Leu Ser Arg Ser Gln Arg Ile Glu Leu Gln  
 355 360 365

Arg Gln Leu Ala Ala Arg Gly His Asp Pro Gly Ala Val Asp Gly Ile  
 370 375 380

Ile Gly Ala Asn Thr Arg Lys Ala Ile Arg Ala Cys Gln Gln Glu Phe  
 385 390 400

Gly Trp Pro Ala Asp Gly Tyr Pro Thr Pro Ala Leu Leu Asp Arg Leu  
 405 410 415

Arg Thr Pro

<210> 32

<211> 398

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 32

Met Arg Ser Leu Leu Leu Ser Ser Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ser Ser Phe Pro Ser Cys Leu Ala Gly Leu  
 20 25 30

Gln Lys Lys Ala Gln Ala Gln Gly Ile Ser Ala Asp Ser Tyr Glu Arg  
 35 40 45

Phe Thr Ser Gly Leu Gln Ala Asp Leu Ser Val Leu Asp Leu Leu Asp  
 50 55 60

Ala Gln Pro Glu Phe Thr Thr Pro Leu Trp Asp Tyr Leu Ala Gly Leu  
 65 70 75 80

Val Asp Glu Gln Arg Val Ser Asp Gly Lys Ala Met Leu Ala Gln His  
 85 90 95

Asp Lys Leu Leu Asp Gln Val Ala Ala Arg Tyr Gly Val Asp Lys Tyr  
 100 105 110

Thr Val Val Ala Val Trp Gly Val Glu Ser Asp Tyr Gly Arg Ile Phe  
 115 120 125

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

ES 2 431 318 T3

<211> 348

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

5 <400> 33

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

ES 2 431 318 T3

Arg Leu Pro Ala Gly Phe Asp Tyr Ser Leu Ala Glu Leu Thr Ile Arg  
225 230 235 240

Lys Pro Leu Gly Glu Trp Gln Gly Met Gly Val Gln Gly Val Asn Gly  
245 250 255

Gly Pro Leu Pro Ser Gly Leu Ser Gly Glu Gln Ala Ser Leu Leu Leu  
260 265 270

Pro Ala Gly His Arg Gly Pro Ala Phe Leu Val Leu His Asn Phe Arg  
275 280 285

Ala Ile Leu Lys Tyr Asn Asn Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Ala Val Gly  
290 295 300

Leu Leu Ala Asp Ser Phe Lys Gly Gly Gly Arg Ile Val Gly Ala Trp  
305 310 315 320

Pro Leu Glu Asp Val Pro Leu Ser Arg Ser Gln Arg Ile Glu Leu Gln  
325 330 335

Arg Gln Leu Ala Ala Arg Gly His Asp Pro Gly Ala  
340 345

<210> 34

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 34

Val Gln Trp Val Gly Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Gly Ala Ala  
1 5 10 15

Gln Ala Gly Asp Tyr Asp Gly Ser Pro Gln Val Ala Glu Phe Val Ser  
20 25 30

Glu Met Thr Arg Asp Tyr Gly Phe Ala Gly Glu Gln Leu Met Gly Leu  
35 40 45

Phe Arg Asp Val Asn Arg Lys Gln Ser Ile Leu Asp Ala Ile Ser Arg  
50 55 60

Pro Ala Glu Arg Val Lys Gln Trp Lys Glu Tyr Arg Pro Ile Phe Ile  
65 70 75 80

Ser Asp Ala Arg Ile Ser Arg Gly Val Asp Phe Trp Asn Lys His Ala  
85 90 95

ES 2 431 318 T3

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

<210> 35

<211> 405

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

ES 2 431 318 T3

<400> 35

Met Arg Asn Pro Glu Arg Ser Ala Leu Leu Lys Val Ser Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Val Val Ala Met Gly Leu Gly Leu Ser Ser Ala Cys Ala  
 20 25 30

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

Thr Lys Ala Pro Phe Ser Gly Ala Gly Pro Ala Ala Ser Val Pro Ala  
 50 55 60

Gly Ala Pro Asn Glu Ala Gln Pro Gly Gln Ser Phe Glu Gln Trp Arg  
 65 70 75 80

Asp Ala Phe Arg Gln Gln Ala Leu Ala Gly Gly Ile Asp Ala Gln Thr  
 85 90 95

Phe Asp Arg Ala Phe Ala Gly Val Gln Pro Asp Pro Ala Val Val Glu  
 100 105 110

Ala Asp Arg Ser Gln Pro Glu Phe Thr Arg Pro Val Trp Lys Tyr Leu  
 115 120 125

Glu Gly Ala Leu Asp Pro Leu Arg Val Arg Gln Gly Gln Ala Arg Leu  
 130 135 140

Ala Gln His Ala Arg Ile Leu Gly Glu Val Asp Ala Arg Tyr Ala Val  
 145 150 155 160

Asp Ala Asp Ala Val Val Ala Ile Trp Gly Met Glu Ser Asn Tyr Gly  
 165 170 175

Ser His Met Gly Asn Lys Asn Val Ile Arg Ser Leu Ala Thr Leu Ala  
 180 185 190

Tyr Glu Gly Arg Arg Pro Glu Phe Ala His Ala Gln Leu Leu Ala Ala  
 195 200 205

Leu Lys Ile Leu Gln His Gly Asp Val Pro Ala Ser Phe Met Ile Gly  
 210 215 220

Ser Trp Ala Gly Ala Met Gly Gln Thr Gln Phe Ile Pro Thr Thr His  
 225 230 235 240

Asn Gln Tyr Ala Val Asp Phe Asp Gly Asp Gly Lys Arg Asp Ile Trp  
 245 250 255

ES 2 431 318 T3

Gly Ser Pro Gly Asp Ala Leu Ala Ser Thr Ala Asn Tyr Leu Lys Ala  
 260 265 270

Ser Gly Trp Ile Ala Gly Gln Pro Trp Gly Phe Glu Val Arg Leu Pro  
 275 280 285

Ala Gly Phe Asp Tyr Ser Leu Ala Glu Leu Thr Ile Arg Lys Pro Leu  
 290 295 300

Gly Glu Trp Gln Gly Met Gly Val Gln Gly Val Asn Gly Gly Pro Leu  
 305 310 315 320

Pro Ser Gly Leu Ser Gly Glu Gln Ala Ser Leu Leu Leu Pro Ala Gly  
 325 330 335

His Arg Gly Pro Ala Phe Leu Val Leu His Asn Phe Arg Ala Ile Leu  
 340 345 350

Lys Tyr Asn Asn Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Ala  
 355 360 365

Asp Ser Phe Lys Gly Gly Gly Arg Ile Val Gly Ala Trp Pro Leu Glu  
 370 375 380

Asp Val Pro Leu Ser Arg Ser Gln Arg Ile Glu Leu Gln Arg Gln Leu  
 385 390 395 400

Ala Ala Arg Gly His  
 405

<210> 36

<211> 367

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 36

Met Arg Arg Thr Ala Leu Ala Leu Pro Leu Phe Leu Leu Val Ser Ala  
 1 5 10 15

Cys Ser Ser Glu Pro Thr Pro Pro Pro Lys Pro Ala Ala Lys Pro Gln  
 20 25 30

Ala Arg Thr Val Ile Ser Pro Arg Pro Val Arg Gln Ser Val Gln Pro  
 35 40 45

Ile Leu pro Leu Arg Gly Asp Tyr Ala Asn Asn Pro Ala Ala Gln His  
 50 55 60

ES 2 431 318 T3

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

ES 2 431 318 T3

Arg Tyr Asn His Ser Thr His Tyr Ala Met Ala Val Trp Glu Leu Gly  
340 345 350

Lys Glu Val Asp Arg Val Arg His Arg Ser Val Val Arg Gln Asp  
355 360 365

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un polipéptido aislado seleccionado de:
- 5 (a) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4;
- (b) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4;
- (c) un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 4;
- 10 (d) un polipéptido aislado que comprende un fragmento de polipéptido, comprendiendo el fragmento al menos 20 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4;
- (e) el polipéptido aislado de (c) del que está eliminada la secuencia de aminoácidos secretora; y
- (f) un polipéptido aislado del que está eliminada la secuencia de aminoácidos secretora que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos de la porción no subrayada de la secuencia de la Figura 4;
- 15 en la que el polipéptido aislado es capaz de producir anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4 y es capaz de provocar una respuesta inmunitaria a *Pseudomonas aeruginosa*.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el polipéptido aislado está conjugado con, o acoplado a, una proteína portadora.
- 20 3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que además comprende un coadyuvante farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que el polipéptido aislado está asociado con un liposoma.
- 25 5. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que el polipéptido aislado está producido recombinantemente mediante un procedimiento que comprende cultivar una célula huésped transfectada con un vector que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido aislado, estando el polipéptido unido operativamente a una región de control de la expresión.
- 30 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el polipéptido aislado de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) está unido a uno o más polipéptidos antigénicos adicionales formando un polipéptido quimérico que comprende dos o más polipéptidos antigénicos que tienen una secuencia seleccionada de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10 o 12 o fragmentos de los mismos, comprendiendo cada uno de los dos o más fragmentos de polipéptidos antigénicos al menos 20 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:2, 4, 6, 8, 10 o 12.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 que comprende un vehículo, diluyente, coadyuvante o liposoma farmacéuticamente aceptable.
- 35 8. Kit para la detección o diagnóstico de una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, comprendiendo dicho kit:
- (a) el polipéptido quimérico según la reivindicación 6;
- (b) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4;
- 40 (c) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4;
- (d) un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4
- (e) un polipéptido aislado que comprende un fragmento de polipéptido, comprendiendo el fragmento al menos 20 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4; y
- (g) el polipéptido aislado de (b), (c) o (d), del que se ha eliminado el péptido de señalización,
- 45 en el que el polipéptido aislado es capaz de producir anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:4.
9. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para usar en el tratamiento

profiláctico o terapéutico de una infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

**10.** Uso de la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la fabricación de una vacuna para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 1 (SEC ID N°: 1)

```

1 ATGCGTAACC CCGAACGATC CGCCCTGCTG AAGGTGAGCG GGCTGCTGGG CAGCACCGTC
61 GTCGCCATGG GGCTTGGCCT CTCCAGCGCC TCGCGGCAGA AGAATCCGAC AGTCGAATAC
121 AACGAGCCTG CCGCTCCCTT GCAGACCAAG GCGCCCTTCT CCGGCGCCGG CCCGGCCGCC
181 TCGGTGCCCG CTGGCGCGCC GAACGAGGCC CAGCCTGGGC AAAGCTTGA ACAGTGGCGC
241 GACGCCTTCC GTCAACAGGC GCTGGCCGGT GGAATCGATG CGCAGACCTT CGATCGCGCC
301 TTCGCCGGCG TCCAGCCCGA TCCCGCCGTG GTCGAAGCAG ACCGCAGCCA GCCGGAATTC
361 ACCGACCCGG TATGGAAGTA CCTGGAAGGC GCCCTCGATC CGCTGCGCGT TCGCCAGGGC
421 CAGGCGCGCC TGGCGCAGCA TCGCGCATC CTCGGCGAAG TCGACGCGCG CTATGCGGTG
481 GATGCGGATG CCGTGGTGGC GATCTGGGGC ATGGAGAGCA ACTACGGTTC GCATCGCGGC
541 AACAAAGAAC TGATCCGCTC CCTGGCGACC CTCGCCATG AAGGACGCCG CCCGGAATTC
601 GCCACGCCCC AGTTGCTCGC CGCCCTGAAG ATTCTCCAGC ACGGCGACGT TCCGGCCTCC
661 TTATGATCG GCTCCTGGGC CGGCGCCATG GGCCAGACCC AGTTCATCCC GACCACCCAC
721 AACGAGTATG CCGTGGACTC CGACGGCGAC GGCAAGCGTG ACATCTGGGG CTCGCGCGGC
781 GACGCCCTGG CCTCCACCGC CAACTACCTG AAAGCCTCCG GCTGGATCGC CGGACAACCC
841 TGGGGTTTCG AAGTCCGCCT GCCGGCAGGC TTCGACTATT CCTGCGCGA ACTCACCATC
901 CGCAAGCCCC TGGGCGAATG GCAAGGGATG GGCGTACAAG GCGTCAACGG CCGCCCCCTG
961 CCTCCGGGAC TCTCCGGCGA ACAGCCCTCG CTGCTGCTGC CGGCCGGCA CCGCGCCCG
1021 GCCTTCCTGG TGCTGCACAA CTTCCGCGCC ATCCTCAAGT ACAACAATC CAGCGCCTAC
1081 GCCTGGCCGG TCGGCTGCTT CGCGACAGC TTCAAGGGCG GCGGCGGAT AGTGGCGCC
1141 TGCCCGCTGG AGGATGTTCC GCTGAGCCGC TCGCAGCGCA TCGAGCTGCA ACCGCAACTG
1201 RKPLGEWQGM GACACGATCC GCGCGCGGTG GATGGCATCA TCGGCGCCA TACGCGCAAG
1261 GCATCCGCG CCTGCCAGCA GAGTTCGGC TGGCCGCGG ACGGCTATCC GACCCGCGC
1321 CTGCTCGACC GCCTGCGGAC GCCATAG
    
```

Figura 2 (SEC ID N°: 2)

```

1 MRNPERSALL KVSGLLSTV VAMGLGLSSA CAQKNPTVEY NQPAAPLQTK APFSGAGPAA
61 SVFAGAPNEA QPGQSFQWR DAFRQOALAG GIDAQTFDRA FAGVOPDPAV VEADRSQPEF
121 TRFWWKYLEG ALDPLRVROG QARLAQHARI LGEVDARYAV DADAVVAIWG MESNYGSHMG
181 NKNVIRSLAT LAYEGRRPEF AHAQLLAALK ILQHGDPVPS FMIGSWAGAM GQTQFIPTTH
241 NQYAVDFDGD GKRDIWSSPG DALASTANYL KASGWLAGQP WGFVRLPAG FDYSLAELTI
301 RKPLGEWQGM GVQGVNNGPL PSGLSGEQAS LLLPAGHRGP AFLVLHNFRA ILKYNSSAY
361 ALAVGLLADS FKGGGRIVGA WPLEDVPLSR SQRIELQRQL AARGHDPGAV DGIIGANTRK
421 ATRACQOEFQ WPAAGYPTFA LLDRLRTP*
    
```

Figura 3 (SEC ID N°: 3)

```

1 ATGAAACGTA TCCTGACCAG CGCCGCGCTG ATCGGTATGA CCACCCTGCT GGCCGCTGC
61 GGCTTCCAAC TGCCGCGCCT GGGCGATGCG CAATTCGCGC TCAAGGAAAT CGAGGTGTCC
121 GCGCGCAACG CCTACGGCCC GRCCGTGCGC GAAGTGAAGG AAACCTTGA AAACAGCGGC
181 GTGAAGGTCA CCAGCAACGC GCCCTACCAC CTGGTGTCTG TCCGCGAGGA CAACCAGCAG
241 CGCACCGTCA GCTACACCGG TTCGCCGCGC GCGCGGAGT TCGAGCTGAC CAACACGATC
301 AACTACGAGA TCGTCCGGCG CAACGACCTG GTCCTGATGA GCAACCAGGT ACAGGTGCAG
361 AAGGTCTACG TGCACGACGA AAACAACCTG ATCGGTTCCG ACCAGGAAGC CGCGCAGCTG
421 CGCAGCGAGA TCGGCGCGGA CCTGATCCAG CAGTTGTCCA TCGCCCTCCA GCGCTGACC
481 CCGCGCAAC TCGACGAAGC CCAGCGCCAG GCAGAAGCCA AGGCCAAGGC GGAAGCCGAA
541 GCCTTGCAGC CCGCCGACGA GCGGAGCGC CAGCGCCCG CCGCCGAGCC GCAGCAGTCC
601 CCGATCGAGT TCCCCACCCC GTGA
    
```

Figura 4 (SEC ID N°: 4)

```

1 MKRIL TSAAL IGMTLLAAC GFQLRGLGDA QFALKEIDVS ARNAYGPTVR ELKETLENSG
61 VKVTENAPYH LVLVREDNQQ RTVSYTGSAR GAEPFELNTI NYEIVGANDL VLMSNQVQVO
121 KVVVHDENNL IGSQEEAQL RSEMRDLIQ QLSMRLQALT PAQLDEAQRQ AEAkakAEAE
181 ALRAADEAER QRRAEPQQS PIEFPTP*
    
```

Figura 5 (SEC ID N°: 5)

```

1 ATGGTGCAAT GGAACACCGC GCGCTGCTC GCCCTGGCCC TGGCGTCCGT GGGTTGCAGC
61 AGCAACAGCA AGAAGGAACT CCCGCCCGCC GAACCTGACCG ACTTCAAAGA GGAAGTCGTG
121 TTGAGCAAGC AGTGGAGCCG CTCGGTCCGT GATGGTCAGG GCGACCTGTA CAACCTGCTC
181 GAACCGGCCG TCGATGGTTC CACCATCTAC GCCCGCTCCG CCGAAGGCCG GGTGATGGCG
241 ATCCAGCGCG AGACCGCGCA CGTCTCTGG AAGAAGGACC TGGAACGTCC GGTTCGCGC
301 GGTGTCGGCG TTGGCTACGG CCTGGTGTG GTGGGTACCC TCGCGGTGA CGTGATCGCC
361 CTCGACGAAG CCACCGGCAA GAAGAAGTGG ACCAAGCGAG TCAACAGCGA AGTGCTGTGG
421 GCGCCGGCCA CCAATGGCGA CGTGGTGGTG GTGCAGACCC AGGACGACAA GCTGATCGGC
481 CTCGATGCGG CCAGCGCGCA CCAGCGCTGG ATCTACGAAA GCACCGTGCC GGTGCTGACC
541 CTGCGCGGCA CCGGCGCGCC GCTGATTGCC GGCAACATGG CCCTGGCTGG CCGGCCAGC
601 GGCAAGGTAG TGGCGGTGCA CGTACAGCGC GGCCTGCCGA TCTGGGAGCA GCGGGTAGCG
661 ATTCCCAGG GCGCTCCGA ACTGGATCGC GTGGTGGACA TCGACGGCGC CCTCCTGCTG
721 TCCGGCGACA CCCTCTACGT GGTACGCTAC CAGGGCCGTG CCGCGGCGCT GGACGTGAC
781 AGCGCCCGCC TGCTCTGGCA GCGCGAAGCG TCGAGCTACG TCGGCGTCCG CGAAGGCTTC
841 GGCAATATCT ACGTCAGCCA GGCCAGCGGT TCGGTGGAAG GCCTGGACTC GCGCGGCGCT
901 TCTTCGCTGT GGAACAACGA CGCCCTGGCG CGTCGCCAAC TGTCGGCTCC GCGGGTGTTC
961 TCCAGCAACG TGGTGGTCCG CGACCTGGAA GGCTACGTG ACCTGCTGAG CCAGGTGGAC
1021 GGTCCGCTPCG TCGGTCCGCA GCGGGTCCGAC AGCGATGGCG TCGGGGTTCG TCCGCTGCTG
1081 GTCGGGAGCT GGATGTACGT GTTCGGCAAC GGTGGCAAGC TCGTCGCCA CACCATCCGC
1141 TAG
    
```

Figura 6 (SEC ID N°: 6)

```

1 MVQWKHAALL ALALAVVGS SNSKELPPA ELTDFKEEVV LSKQWSRVS DGQDLYNLL
61 EPAVDGSTIY AASAEGRVMA IQRETGDVLW KDLERFVSG GVGVGYLVL VGLRGLDVLV
121 LDEATGKKRW TKRVNSEVLS APATMGDVVV VQTQDDKLIQ LDAASGDQRW IYESTVPVLT
181 LRGTGAPLIA GNMALAGLAS GRVVAVDVQR GLPIWQRVA IPQRSELDL VVDIDGGLLL
241 SCDTLVVSY QGRAALDWN SGRLWQREA SSVVGVAEGF GNIYVQASG SVEGLDSRGA
301 SSLWNNDALA RRQLSAPAVF SSVVVVDLE GYVHLLSQVD GRFVGRERVD SDGVRVRPLV
361 VGSWMYVFGN GGLVAYTIR*
    
```

Figura 7 (SEC ID N°: 19)

```

1 ATGCGCAGCC TTCTTCTCTC CTCGCTGGCC CTGCTACCCG CCCTGGCCCT GGCGCAACCC
61 GACGCCTCGA GCTTCCCTTC CTGCCTCGCC GGCCTGCAGA AGAAGGCCCA GCGCGAGGCC
121 ATTTCCGCCG ACAGTTATGA GCGCTTACC AGCGGCCTGC AGGCCGACCT CAGCGTGCTC
181 GACCTGCTCG ACGCGCAGCC GGAGTTCACC ACCCCGCTGT GGGACTACCT GGCCGGCCTG
241 GTGGACGAGC AGCGGGTCAG CGATGGCAAG GCGATGCTCG CCCAGCACGA CAAGCTGCTC
301 GACCAGGTGG CCGCGCGCTA CCGCGTGGAC AAGTACACGG TGGTGGCGGT GTGGGGCGTG
361 GAAAGCGACT ACGGGCGGAT CTTCCGGCAAG CGTCCGCTGC TGACCTCGCT GTCGACCTG
421 TCCTGCTACG GCGCGCGCCA GTCGTTCTTC CAGGGCGAGT TCCTCGCCAC CCTGAAGCTG
481 TTGACGGCCG GCGACATCCG CGACGCGGCG ATCACC GGCT CCTGGGCGCG GGCCTTCGGC
541 CATACCCAGT TCATGCCATC GACCTAGCGC CGGATCGCCG TGACTTTCGA CGGCCACGGT
601 CGCCGCGACC TGGTAGGCAG CGTGCCGGAT GCCCTCGGTT CCACCGCAA CTACCTGAAG
661 AAGGCTGGCT GCGCACGGG ACAGCCGTGG GGCTATGAAG TGAAGGTGCC GGCCGACTTC
721 CCGCCAGCC TGGCCGGGCG CCGCAAGCGC CAGCCGCTGT CGGCTGGGT CGCCCGTGGG
781 GTGAGGCGGG TCGACGGCCA GCGCTGCGC GCGCGGACG AGAAGGCCCG GATCCTCTTC
841 CCGCCCGGGG CCCAGGGCCC GGCCTTCTTC GTCTATCGCA ACTACGATGC GATCTATTCC
901 TACAACGCCG CGGAAAGCTA CCGCTGGCC ATCGCCCTGC TTTCCGACCG CCGCGCGGC
961 GGCAGCGGCC TGGTGGCGTC CTGGCCGACC GACGACCCGG GCATCAGCCG GCTCGAGCCG
1021 AAGCAATTGC AGAAGGCGTT GCTGGCCGCG GGCTACGACA TCGGCGAGGC CGACGGCGCTG
1081 ATCCGCACCA GCACGCGCAA GCGGATCCAG GCCGAGCAGA AGCCCTCGG CTGACCCCG
1141 GCCACGGTC GCGCCGGGCG CAAGATCCTC GAGGCGCTGA AGGGCGCCA GCCCTGA
    
```

Figura 8 (SEC ID N°: 20)

```

1 MRLLLLSSLA LLPALALAQF DASSFPSCLA GLQKKAQAQG ISADSYERFT SGLQADLSVL
61 DLLDAQPEFT TPLWDYLAGL VDEQRVSDGK AMLAQHDKLL DQVAARYGVD KYTVVAVWGV
121 ESDYGRIFGK RPLLTSLSTL SCYGRRQSFY QGEFLATLKL LQAGDIRDAG ITGSWAGAFG
    
```

181 HTQFMPSTYA RIAVDVFDGDG RRDLVGSVPD ALGSTANYLK KAGWRTGQPW GYEVKVPADF  
 241 PASLAGRGRK QPLSAWVARG VRRVDGQPLP GGDEKRAILL PAGAQGPAPL VYRNYDAIYS  
 301 YNAAESYALA IALLSDRLRG GSGLVASWPT DDPGLSRLER KQLQKALLAR GYDIGRADGL  
 361 IGTSTRKAIQ AEQKRLGLTF ADGRAGRKIL EALKGAQF\*

Figura 9 (SEC ID N°: 21)

1 GTGAAGAACG CAATGCAAGT ACTGCGTACA TGGGCGGCCA GGGGCGTCCA ATGGGTGGCG  
 61 GTAGCGGGCG TCATTGGCCT GTCCGGGGCG GCCCAGGCGG GGGACTACGA CGGCTCGCCG  
 121 CAAGTGGCCC AGTTCGTGAG CGAAATGACC CGCGACTACG GCTTCGCCGG AGAGCAGCTG  
 181 ATGGGGCTGT TCCGCGACGT GAACCGCAAG CAGTCCGATCC TCGATGCGAT CTCGCGCCCG  
 241 GCCGAGCGGG TCAAGCAGTG GAAGGAATAC CGGCCGATCT TCATCAGCGA CGCGCGCATC  
 301 AGTCGTGGCG TCGACTTCTG GAACAAGCAT GCCGAAGACC TGGCGCGGGC GGAGAAGGAA  
 361 TACGGCGTGC CGGCCGAGAT CATCGTCTCG ATCATCGGCG TGGAAACCTT CTTGGGCCGC  
 421 AACACCGGCA GTTACCGGGT GATGAGCGCG CTGTCCACCC TCGGCTTCGA CTACCCGCGG  
 481 CGGGCCGACT TCTTCGCAA GGAGTTGCGC GAGTTCCTCC TGTTCGCCC CGAACAGCAG  
 541 GTCGACCCGC TCAGCCTGAC CGGCTCCTAC GCCCGCGCLA TGGGCTGCC ACAATTTCATG  
 601 CCGAGCAGCT TCCGCGCCTA CGCGGTGGAC TCGACGGCG ATGGCCACAT CAATATCTGG  
 661 AGCGACCCGA CCGATGCCAT CGGTAGCGTC GCCAGCTACT TCAAGCAGCA CGGCTGGGTC  
 721 ACCGGCGAGC CGGTGGTCTC GGTGGCCGAG ATCAACGACG AGAGCGCCGA GAGCGCGGTG  
 781 ACCAGGGGCG TCGACCCGAC CATGAGCCTG GCGCAGCTGC GTGCCCGCGG CTGGCGCACC  
 841 CAGGATGCGC TCGCGGACGA CCAGAAGGTC ACGCGGATGC GTTTCGTGCG CGACAAGGGC  
 901 ATCGAGTATT GGGTCGGTTT GCCGAACCTC TACGTGATCA CCGCTATAA TCGCAGCGCC  
 961 ATGTATGCCA TGGCGGTTTA TCAGCTGGCG GCGCAGATTG CCGCGCGCGG AGGTGCCCAT  
 1021 TGA

Figura 10 (SEC ID N°: 22)

1 MKNAMOVLRW WAARGVOWVG VAGVIGLSGA AORGDYDGP QVAEFVSEMT RDYGFAGEQL  
 61 MGLFRDVMRK QSILDAISRP AERVKQWKEY RPIFLSDARI SRGVDFWNKH AEDLARAEBE  
 121 YGVPAEIIVS IIGVETFFGR NTGSYRVMDA LSTLGFYPP RADPFRKELR EPLLAREQQ  
 181 VDPLSLTGSY AGAMGLPQFM PSSFRAYAVD FDGDGHINIW SDPTDAIGSV ASYFKQHGWW  
 241 TGEVVSVAE INDESARSAV TRGVDPMTSL GELRARGWRT HDALRDCQKV TAMRFVGDGK  
 301 IEFVWGLENF YVITRYNRSB MYAMAVYQLA GELARARGAH \*

Figura 11 (SEC ID N°: 23)

1 ATGCGCCGTA CCGCCCTGCG CCTGCCCTG TTCTTCTGG TCTCAGCATG CAGCAGCGAA  
 61 CCGAGGCCAC CACGAAACC CGCCGCCAAA CCCAGGCC GCACCGTCAT TTCACCCCGC  
 121 CCGCTACGCC AGTCGGTGCA ACCGACTACT CCGCTGCGCG GCGATTACGC GAACAATCCG  
 181 GCGGCACAGC ACTTCATCGA CAGGATGGTC AGCCAGCAGG GCTTCAACCG CCAGCAACTG  
 241 CAGCATCTGT TCGCCAGAC CCAGCGCCTG GACTGGGTGA TCCGCTGAT GGACCGGCAA  
 301 GCCCGGACCT ATACCCACC CAGCGGACCG AACGGCCCT GGTGCGGCTA CCGGAAGAAG  
 361 TTCGTACGCG CAGGCAACGT ACAGAACGGC GTGCTGTTCT GGGACCAATA CGAAACCGAC  
 421 CTGCAACGGG CATCGCGCGT CTACGCGGTG CGCCCGAGA TCATCGTGG CATCATCGGC  
 481 GTGGAAACCC GCTGGGGGCG TGTGATGGCG AAGACGCGGA TCATCGATGC GCTGTCCACC  
 541 CTGTCTTCT CTAACCTCG CCGCGGGAA TTCCTCAGCG GCGAACTGGA GCAATTCCTC  
 601 CTCCAGGCGC GCAGGAAGG CACCGACCCG CTGGCCCTGC GCGTTCCTA TGCCGCGGCC  
 661 ATGGGCTACG GCCAGTTCAT GCCGTCTTCA TTCACCAAGT ACGCGGTGGA CTTCGATGGC  
 721 GATGGGCATA TCGACCTGTG GAATCCCGGT GACGCCATCG GCAGCGTGC CAACTATTTT  
 781 AAGCAGCACG GCTGGGTGAG CCGGATCGC GTGGCGGTC CCGCAGTGG CCGGGCTCCC  
 841 TCGCTGGAAG ATGGCTTCAA GACGCTGTAC CCGCTGGACG TGCTGCTTC CGCCGATTA  
 901 CGCCCGCAGG GTCCCTCGG CCGCCACCGG CAAGCCAGCC TGCTGCGCCT GGACATGGGC  
 961 AGGAACCTACC AGTACTGGTA CCGCCTGCCG AACTTCTACG TGATCACCCG CTATAACCAC  
 1021 AGCACCCACT ACGGATGGC CGTCTGGGAA CTGGCAAGG AAGTCGACCG GGTGCGTCAC  
 1081 CGCTCCGTCG TCAGGCAGGA TTAG

Figura 12 (SEC ID N°: 24)

1 MRRTALALEL ELLVSACSSE PTPPPKPAK PQARTVISPR PVRQSVQPII PLRGDYANNP  
 61 AAQHPIDRMV SOHGPNRQQL HDLFAQTQRL DWVIRLMDRQ APTVTPPSGF NGAWLRYRKK  
 121 FVTPGNVQNG VLPWDQYETD LQRASRVYGV PPEIIVGIIIG VETRWGRVMG KTRIIDLALST  
 181 LSFYPRRAE PFSGELEQFL LQARKECTDP LALRGSYAGA MGYGQFMPSS PTKYAVDFDG

241 DGHIDLWNPR DAIGSVANYF KQHGWSGDR VAVPASGRAP SLEDGFKTLY PLDVLASAGL  
 301 RPQGLGGHR QASLLRLDMG RNYQYWYGLF NPYVITRYNH STHYAMAVWE LGKEVDRVRH  
 361 RSVVRQD\*

Figura 13

	30	40	50	60	70	80
SPA-1	ACAQKNPTVEYNQPAAPLOTKAPFSGAGPAASVPAGAPNEAQP-GOSFEQWRDAFRQAL					
SHB-PA104	MRSLLSSSLALLPALA--LAQPDASSFPSCLAGLQKKAQ					
			10	20	30	
	90	100	110	120	130	140
SPA-1	AGGIDAQTFDRAFAGVQPDPAVVEADRSQPEFTRPVWKYLEGALDPLRVRQGQARLAQHA					
SHB-PA104	AQQISADSYERFTSGLQADLSVLDLLDAQPEFTPLWDYLAGLVDEQRVSDGKAMLAQHD					
	40	50	60	70	80	90
	150	160	170	180	190	200
SPA-1	RILGEVDARYAVDADAVVAIWGMESNYGSHMGKNVIRSLATLAYEGRRPEFAHAQLLAA					
SHB-PA104	KLLDQVAARYGVDKYTVVAVWGVESDYGRIFGKRPLLSLSTLSCYGRRQSFQGEFLAT					
	100	110	120	130	140	150
	210	220	230	240	250	260
SPA-1	LKILQHGDPVASFMIKSWAGAMGQTOFIPTHNQYAVDFDGDGKRDIWGSFGDALASTAN					
SHB-PA104	LKLQAGDIRDAGITGSWAGAFGTQFMPSTYARIAVDFDGDGRRDLVGSVPDALGSTAN					
	160	170	180	190	200	210
	270	280	290	300	310	320
SPA-1	YLKASGWIAGQPWGFVRLPAGFDYSLAELTIRKPLGEWQGMVQGVNGGPLEPSGLSSEQ					
SHB-PA104	YLKAGWRTGQPWGYEVKVPADFPASLAGRGRQPLSAWVARGVRRVDGQPLPGG--DEK					
	220	230	240	250	260	270
	330	340	350	360	370	380
SPA-1	ASLLLPAHGRGPAFLVHLNFRAILKYNSSAYALAVGLLADSFKGGGRIVGAWPLEDVPPL					
SHB-PA104	AAIILLPAGAQQPAFLVYRNYDATYSYNAESYALALALLSDRLRGGSGLVASWPTDDPGI					
	280	290	300	310	320	330
	390	400	410	420	430	440
SPA-1	SRSQRTELQROLAARGHDPGAVDGIIGANTRKAIRACQQEPGW-PADGYPTALLDRLRT					
SHB-PA104	SRLERKQLOKALLARGYDIGEADGLIGTSTRKAIQAEQKRLGLTPADGRAGRKILEALKG					
	340	350	360	370	380	390
SPA-1	P					
SHB-PA104	AQP					

Figura 14

	70	80	90	100	110
SPA-1	VPAGAPNEAQPQGSFEQWRDAFRQALAGGIDAQTFDRAFAGVQPDPAVVEADRSQF---				
SHB-PA105	VQWVGAVGVIGLSGAAQAGDYDGSQVAEFVSEMTRDYGFAGEQLMGLFRDVRNRKQSILD				
	20	30	40	50	60
	120	130	140	150	160
SPA-1	EFTRPV-----WK-YLEGALDPLRVRQGQARLAQHARILGEVDARYAVDADAVVAIWGME				
SHB-PA105	AISRPAERVKQWKEYRPIFISDARISRGVDFWNKHAEDLARAKEYGVPAEIVSIIIGVE				
	80	90	100	110	120

