

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 440**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

C07K 14/235 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2005 E 05815467 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 1828378**

54 Título: **Desacilación de LPS en bacterias Gram negativas**

30 Prioridad:

17.12.2004 EP 04078445

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

11.09.2014

73 Titular/es:

**DE STAAT DER NEDERLANDEN, VERT. DOOR
DE MINISTER VAN VWS, MINISTERIE VAN
VOLKSGEZONDHEID, WELZIJN EN SPORT
(100.0%)
Parnassusplein 5
2500 EJ Den Haag, NL**

72 Inventor/es:

**TOMMASSEN, JOHANNES PETRUS MARIA;
VAN DER LEY, PETER ANDRÉ y
GEURTSSEN, JEROEN JOHANNES GERARDUS**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 493 440 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

Desacilación de LPS en bacterias Gram negativas

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al área de la microbiología, en particular la biología de síntesis y modificación de los LPS (lipopolisacáridos) de bacterias Gram negativas. La invención también se refiere al campo de la medicina, en particular al campo de la vacunación contra patógenos bacterianos. La presente invención además se refiere a bacterias Gram negativas, lipopolisacáridos bacterianos de Gram negativas (LPS) y composiciones que constan de LPS, que pueden usarse con fines farmacéuticos y/o veterinarios, en particular para la preparación de vacunas contra Gram negativas tal como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*. La invención además dispone vacunas que constan de LPS desacetilados, y el uso de LPS modificados y detoxificados en la preparación de vacunas de células enteras y vacunas acelulares.

Antecedentes de la invención

[0002] La infección por *Bordetella pertussis* es un agente causante de tos ferina, con un número estimado de 60 millones de casos cada año, causando la muerte de aproximadamente 355.000 personas a nivel mundial cada año (OMS), en particular niños e individuos con sistemas inmunitarios comprometidos. Aunque se encuentra disponible el tratamiento con antibióticos (eritromicina), para cuando la enfermedad es diagnosticada, frecuentemente las toxinas bacterianas han causado daños severos. La prevención de la enfermedad es, por lo tanto, de gran importancia. Uno de los principales medios de control es la vacunación. De forma convencional, las vacunas contra las infecciones de *pertussis* ("tos ferina") se han basado en células enteras de *B. pertussis*. Las vacunas de células enteras de *Bordetella pertussis*, que comprenden bacterias enteras matadas por tratamiento térmico, formalina u otros medios, han sido incluidas en programas generales de vacunación desde principios de los años 50.

[0003] La inmunización con la vacuna de células enteras de *pertussis*, a la vez que resulta eficaz en la prevención de la tos ferina en bebés, se ha asociado con reacciones neurológicas, locales y sistémicas, incluyendo fiebre, convulsiones y encefalopatía en niños. Los LPS son responsables de la mayor parte de las reacciones adversas en niños tras la inmunización de *pertussis*. Cuando se producen infecciones bacterianas en animales, los LPS o su fracción de lípido A activan el sistema inmunológico innato mediante la interacción con receptores de tipo Toll, principalmente mediante TLR-4. La respuesta del infectado para lípidos A menudo incluye la producción de péptidos antimicrobianos catiónicos, citocinas, quimioquinas y moléculas inmunoestimuladoras adicionales. En algunas infecciones, la respuesta del lípido A ayuda a alejar a la bacteria, pero en sepsis incontrolables, los altos niveles de citocinas circulantes y la actividad que favorece la coagulación pueden dañar la microvasculatura y precipitar el síndrome de shock séptico por Gram negativas con coagulación intravascular diseminada.

[0004] No hay pruebas concluyentes disponibles acerca del papel de protección que los LPS juegan en las vacunas de *pertussis*, sin embargo los experimentos de inmunización pasiva en ratones han demostrado que los anticuerpos contra LPS pueden conferir un nivel de protección. Además y de forma más importante, la presencia de LPS en una vacuna no obstante proporciona actividad adyuvante para aumentar la respuesta inmune contra otros antígenos (K. Mills: Immunity to *Bordetella pertussis*. Microbes and Infection 3: 655-677 (2001)).

[0005] El interés sobre la seguridad ha afectado inversamente al entendimiento de la vacuna y ha motivado el desarrollo de vacunas de *pertussis* acelulares, preparadas con antígenos altamente purificados de *B. pertussis*. En los últimos años, además de las denominadas "vacunas de células enteras" o "VCEs", también las vacunas acelulares o "VACs" han sido ahora introducidas en diferentes países.

[0006] Las vacunas acelulares normalmente comprenden de 1 a 3 o más antígenos del organismo patógeno. En el caso de los antígenos de *B. pertussis* comúnmente se utilizan los siguientes: toxina de *pertussis* (PT, normalmente tratada para la destrucción de su toxicidad al mismo tiempo que logra retener la inmunogenicidad), hemaglutinina filamentosa (FHA), fimbrias, y la proteína 69kD o pertactina (Pm). En general, la reactogenicidad de las vacunas acelulares es muy inferior a la reactogenicidad de la vacuna de célula enteras. Las vacunas acelulares se asocian con una frecuencia significativamente reducida de reacciones sistémicas (fiebre, vómitos, irritabilidad, anorexia) y reacciones locales (inflamación, rojez, calor, sensibilidad, rigidez, dolor). No obstante, los datos clínicos son todavía controvertidos en cuanto a si la inmunidad protectora de las vacunas acelulares se combina con el efecto protector de las vacunas de células enteras. En muchos estudios el efecto protector de las vacunas de células enteras resulta ser superior y en la actualidad se mantiene un debate sobre si esto pesa más que los riesgos de los raros pero graves efectos adversos de las vacunas de células enteras en bebés. Actualmente se han evaluado varios esquemas de inmunización, donde se dan hasta seis dosis de vacuna acelular. La vacuna de células enteras fue dada inicialmente 5 veces, incorporada al calendario rutinario de vacunas rutinario con la última dosis adicional dándose entre los 4 y 6 años de edad. Se

recomienda ahora que la vacuna acelular de pertussis se de 6 veces incluyendo una última dosis (combinada con la vacuna del tétanos-difteria) durante la pubertad. La vacuna acelular parece ser más segura que la vacuna de células enteras, pero ambas no deberían darse en niños con reacciones alérgicas previas a la vacuna de pertussis.

[0007] Los efectos secundarios adversos de las vacunas de células enteras de pertussis han sido bien documentados en la técnica (ver: S.H. Yeh: persistent pathogen, imperfect vaccines. Expert Rev. Vaccines 2: 113-127 (2003)). Aunque las vacunas acelulares son usadas actualmente en parte para superar estos efectos secundarios adversos, la inmunidad protectora proporcionada por las mismas sigue resultando controvertida y deja mucho espacio para su mejora. En un modelo con ratones se encontró de forma significativa una protección superior a largo plazo con células enteras en comparación con las vacunas acelulares (K. Mills: Immunity to *Bordetella pertussis*. Microbes and Infection 3: 655-677 (2001)). Por otra parte, las vacunas acelulares son más costosas y más difíciles de producir, requiriendo aislamiento, una extensa purificación y control de calidad de varios antígenos y su mezcla y formulación en las cantidades óptimas / deseadas. Claramente existe una gran necesidad de mejora de las vacunas contra *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* y otras bacterias Gram negativas.

Descripción detallada de la invención

[0008] La presente invención proporciona métodos y medios para la preparación de vacunas mejoradas contra pertussis. La invención divulga nuevas proteínas de *Bordetella*. Estas nuevas proteínas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* y moléculas de ADN que codifican estas proteínas se usan de acuerdo con la invención con el fin de modificar el lípido A y así proporcionar nuevas cepas bacterianas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* y otras células bacterianas Gram negativas, constando de al menos LPS detoxificados y 3-O-desacetilados parcialmente. La presente invención también proporciona composiciones mejoradas para la vacunación, constando de células bacterianas de especies de *Bordetella* que comprenden LPS 3-O-desacetilados parcialmente, composiciones farmacéuticas que comprenden LPS aislados y al menos LPS parcialmente 3-O-desacetilados o LPS 3-O-desacetilados in vitro. La divulgación además proporciona anticuerpos específicos y dirigidos contra el lípido A 3-O-desacetilado y/o moléculas de LPS.

[0009] Los lipopolisacáridos (LPS), componentes principales de la membrana bacteriana externa de Gram negativa, son conocidos por su importancia en el funcionamiento de dicha membrana como barrera de permeabilidad y por su resistencia contra la lisis complementada y mediada por células (visto en 1). Consta de tres dominios covalentemente enlazados: el lípido A, el núcleo, y el antígeno O. El lípido A forma el anclaje de la membrana hidrofóbica y es el responsable de la actividad endotóxica de los LPS. En *Escherichia coli*, consta de un disacárido de glucosamina 1,4'-bifosforilado β -1,6-vinculado, que se sustituye con residuos de ácidos R-3-hidroximirísticos en las posiciones 2, 3, 2', y 3' por medio de éster o enlace amídico. Los grupos secundarios de lauroilo y miristoilo sustituyen al grupo hidroxilo de R-3-hidroximiristoilo en las posiciones 2' y 3' respectivamente (Fig. 1A). Estudios precedentes han mostrado que los grupos de fosfato, el disacárido de glucosamina y el número y longitud correcto de las cadenas de acilo son importantes para la actividad biológica del lípido A (1, 2,3).

[0010] La estructura básica del lípido de A se conserva razonablemente bien entre bacterias Gram negativas, aunque se han observado ligeras variaciones en el patrón de las sustituciones de los dos fosfatos y en el número y longitud de la cadena de acilo (4,5). Las modificaciones adicionales del lípido A (Fig. 1B) se regulan en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) por el sistema regulador de dos componentes PhoP/PhoQ (6,7). En respuesta a los bajos niveles de Mg^{2+} , la quinasa del dominio sensor PhoQ fosforila y activa así el activador transcripcional PhoP, que lleva a la activación o represión de 40 genes diferentes (6,8). Un segundo sistema regulador implicado en la modificación del lípido A es el sistema de dos componentes PmrA/PmrB, que por sí mismo se regula mediante PhoP/PhoQ (9,10). Las mutaciones con alteraciones en el sistema PhoP/PhoQ muestran una virulencia reducida y una susceptibilidad aumentada a péptidos anti-microbianos (11,12). Se han identificado homólogos de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB en otras bacterias Gram negativas, incluyendo *E. coli*, *Yersinia pestis*, y *Pseudomonas aeruginosa* (13,14).

[0011] Hasta la fecha, se han identificado varias enzimas modificadoras del lípido A. La sustitución de los grupos de fosfatos 1 y 4' con una o dos fracciones de 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) en *S. Typhimurium* resultó depender de la enzima ArnT (15). Recientemente, se ha identificado a la prometina PmrC como mediadora en la adición de fosfoetanolamina (pEtN) al lípido A en *Salmonella enterica* (16). Otra enzima, designada LpxO, cataliza la hidroxilación dependiente de O_2 del lípido A (17), y una 1-fosfatasa de lípido se identificó en *Rhizobium leguminosarum* (18). Se considera que todas estas enzimas deben residir en la membrana interna o en el espacio periplásmico (15, 16, 17,18). Recientemente ha sido descubierta una nueva clase de enzimas modificantes del lípido A, localizadas en la membrana externa. Una de éstas es la palmitoiltransferasa PagP (19). La palmitoilación del lípido A conlleva un aumento de la resistencia a péptidos anti-microbianos catiónicos (7). Además, el lípido A palmitoilado provoca la activación inducida de LPS en células humanas (20). Se han encontrado homólogos de PagPs, entre otros, en *S. Typhimurium*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella Parapertussis*, *Legionella pneumophila*, *E. coli*, y *Y. pestis* (19,21).

[0012] Otra enzima modificante del lípido A localizada en la membrana externa es la PagL 3-O-deacilasa (22). Esta enzima fue descubierta en *S. Typhimurium* y se mostró que hidroliza el enlace estérico en la posición 3 del lípido A, liberando así la fracción primaria de 3-hidroximiristoilo (22). Hasta el momento, no han podido encontrarse homólogos obvias de la PagL en las bases de datos de microbios no redundantes o inacabadas, excepto en las que se relacionan estrechamente con las especies de *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* (22). Sin embargo, otras bacterias Gram negativas, incluyendo *P. aeruginosa* (14), *R. leguminosarum* (23), *Helicobacter pilori* (24), y *Porphyromonas gingivalis* (25) contienen especies de lípidos A 3-O-desacetilados, lo que sugiere que estos organismos contienen enzimas con una actividad similar a la PagL.

[0013] La presente invención divulga la identificación de homólogos de PagL en una variedad de bacterias Gram negativas. Se usaron las similitudes de la secuencia limitada entre distintas proteínas y avanzadas herramientas de la bioinformática con el fin de identificar estos homólogos y sus residuos de sitio activo. En esta especificación, se describe la presencia y uso de homólogos de PagL para su expresión heteróloga en una variedad de bacterias Gram negativas. Aunque la similitud en general de la secuencia con genes de pagL conocidos procedentes de *Salmonella spp.* es más bien baja, puede distinguirse la conservación de un dominio de PagL en la región terminal C.

[0014] Las técnicas previas sólo describen las proteínas de PagL procedentes de *Salmonella spp.* y divulgan la expresión heteróloga de pagL solo en *E. coli* (22), dando como resultado LPS desacetilados. No hay datos disponibles en la técnica acerca de la presencia de homólogos de PagL en otras bacterias Gram negativas. La expresión de heterólogos de la PagL en otras bacterias Gram negativas, en caso de que la PagL sea funcional en otras Gram negativas, el efecto de la PagL en la composición de lípido A / LPS y la viabilidad bacteriana, toxicidad e inmunogenicidad en otras Gram negativas resultan ser todos ellos factores desconocidos. Sólo se encuentran disponibles datos limitados para expresiones heterólogas de PagL de *Salmonella* en *E.coli*, donde una respuesta TLR se midió en células que expresaban el receptor recombinante humano TLR4, lo cual no refleja una situación natural de infección por Gram negativas (Kawasaki et al., J Biol Chem. 2004).

[0015] La actual especificación divulga la actividad de los homólogos de PagL de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella bronchiseptica*, lo que se confirmó sobre la expresión heteróloga en *Escherichia coli* y *Bordetella spp.*, resultando en la eliminación de un grupo de R-3-hidroximiristoilo perteneciente al lípido A. El efecto en la actividad biológica de los LPS fue analizado con células macrófagas humanas. En cuanto a la desacilación por PagL, el lípido A de *E. coli* (pero no el lípido A de *B. pertussis*) fue sometido a otra modificación, la cual fue el resultado de la actividad de la palmitoil transferasa endógena de la PagP. Además, se identificó una pareja de histina-serina conservada como residuos de sitio activo, sugiriendo un mecanismo catalítico similar al de las hidrolasas de serina. Finalmente, se demuestra la actividad *in vitro* de la PagL en sustratos de LPS. La función biológica de la PagL puede aplicarse de acuerdo con la invención para modificar la patogenicidad, toxicidad e inmunogenicidad de Gram negativas. Esta modificación puede tener lugar en células bacterianas enteras o partes, fracciones o compuestos derivados de las mismas. La invención en última instancia proporciona nuevas vacunas contra las infecciones bacterianas de Gram negativas, constando de células enteras de bacterias Gram negativas de acuerdo con la invención o lípido A / LPS modificado obtenible y/o aislado de estas bacterias, o moléculas modificadas *in vitro* de LPS / lípido A.

Descripción detallada

Definiciones:

[0016] "Identidad de secuencia" se define en la presente como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptidos o proteínas) o dos o más secuencias de ácido nucleico (polinucleótidos), como se ha determinado mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también tiene el significado del grado de relación de la secuencia entre las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, como podría ser el caso, como se determina por la correspondencia entre las cadenas de tales secuencias. La "similaridad" entre dos secuencias de aminoácidos se determina por la comparación de la secuencia de aminoácido y los sustitutos del aminoácido conservado de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. La "identidad" y la "similaridad" pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo pero no limitándose a los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988 ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993 ; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987 ; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

[0017] Los métodos preferibles para determinar la identidad son diseñados para brindar la mayor correspondencia probada entre las secuencias. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos con programas informáticos preferibles a la hora de determinar la

identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, por ejemplo, GCG program package (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible para el público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894 ; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). El conocido algoritmo de Smith Waterman también puede usarse para determinar la identidad.

[0018] Los parámetros preferibles para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes: Algorithm: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 89:10915-10919 (1992); Penalización por Gap: 12; y longitud de la penalización por Gap: 4. Un programa útil con estos parámetros se encuentra disponible públicamente como el programa "Ogap" del Genetics Computer Group, ubicado en Madison, WI. Los parámetros ya mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para las comparaciones de aminoácidos (junto con la no penalización por gaps finales). Los parámetros preferibles para la comparación de ácido nucleico incluye los siguientes: Algorithm: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); matriz de comparación: coincidencias=+10; no coincidencias=0; penalización de gap: 50; longitud de penalización del gap: 3. Disponible como el programa de gaps del Genetics Computer Group, localizado en Madison, Wisconsin. Los parámetros arriba mostrados son los parámetros por defecto para las comparaciones de ácido nucleico.

[0019] Opcionalmente, a la hora de determinar el grado de similitud de aminoácidos, el experto en la materia también puede tener en cuenta las sustituciones de los denominados aminoácidos "conservados", como se aclarará al experto en la materia. Las sustituciones de aminoácidos conservados se refieren a la intercambiabilidad de residuos con cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos con cadenas alifáticas laterales es el de glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos con cadenas alifáticas de hidroxilo laterales es serina y treonina; un grupo de aminoácidos con cadenas lateral que contiene amida es el de asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos con cadenas aromáticas laterales es el de fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales de ácidos es el de ácido aspártico y ácido glutámico y un grupo de aminoácidos con cadenas laterales de azufre es el de cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservados preferibles son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Las variantes de sustitución de la secuencia de aminoácidos aquí descritas son aquellas en las que al menos un residuo en las secuencias descritas ha sido eliminado y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Preferiblemente, el cambio de aminoácido es conservativo. Las sustituciones conservativas preferibles para cada uno de los aminoácidos de origen natural son como se describen a continuación: Ala por ser; Arg por lys; Asn por gln o his; Asp por glu; Cys por ser o ala; Gln por asn; Glu por asp; Gly por pro; His por asn o gln; Ile por leu o val; Leu por ile o val; Lys por arg; gln o gln; Met por leu o ile; Phe por met, leu o tyr; Ser por thr; Thr por ser; Trp por tyr; Tyr por trp o phe; y Val por ile o leu.

[0020] Un segmento de ADN de acuerdo con la presente invención está "operativamente enlazado" cuando se coloca en una relación funcional con otro segmento de ADN. Por ejemplo, un promotor o intensificador se encuentra operativamente enlazado a una secuencia codificante si éste estimula la transcripción de la secuencia. El ADN para una secuencia señal se encuentra operativamente enlazada al ADN que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido. Generalmente, las secuencias de ADN que están enlazadas operativamente son contiguas, y, en el caso de una secuencia señal, ambas son contiguas y se encuentran en fase de lectura. No obstante, los potenciadores necesitan no ser contiguos a las secuencias de codificación cuya transcripción controlan. El enlace se realiza por ligadura a sitios de restricción convenientes o a adaptadores o enlaces insertados en el lugar del mismo.

[0021] La selección de una secuencia promotora apropiada generalmente depende de la célula huésped seleccionada para la expresión del segmento de ADN. Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas incluyen a los promotores procarióticos y eucarióticos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001, supra). Las secuencias reguladoras transcripcionales típicamente incluyen un promotor o intensificador heterólogo que es reconocido por el huésped. La selección de un promotor apropiado depende del huésped, pero se conocen y se encuentran disponibles promotores tales como trp, lac y promotores fago, promotores ARNt y promotores de enzima glucolítica (ver, por ejemplo Sambrook y Russell, 2001, supra). Los vectores de expresión incluyen el sistema de replicación y pueden emplearse secuencias reguladoras traslacionales y transcripcionales junto con el sitio de inserción para el segmento de codificación de polipéptidos. Ejemplos de combinaciones factibles de líneas celulares y vectores de expresión son los descritos en Sambrook y Russell (2001; supra) y en Metzger et al. (1988) Naturaleza 334: 31-36. Por ejemplo, pueden expresarse vectores de expresión adecuados en levadura, por ejemplo *S.cerevisiae*, células de insecto, por ejemplo, células Sf9, células de mamíferos, por ejemplo, células CHO y células bacterianas, por ejemplo, *E. coli* o *Bordetella spp.*

[0022] En una primera forma de realización, la divulgación actual proporciona nuevos polipéptidos que comprenden actividad de 3-O-deacilasa de lípido A, por la cual el polipéptido muestra al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o

99% de identidad de aminoácido con SEC ID nº 1 y el polipéptido muestra actividad de 3-O-deacilasa de lípido A como se determina en los ensayos descritos en esta especificación, *in vivo*, como se muestra en el ejemplo 3 o *in vitro*, según el Ejemplo 9. Preferiblemente el polipéptido con actividad de 3-O-deacilasa de lípido A es el polipéptido de acuerdo con SEC ID nº 1, la proteína PagL de *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella parapertussis*, o una parte de la misma, un mutante de la misma, o una proteína de fusión que comprende al menos una parte de la SEC ID N°1 que consta de actividad de 3-O-deacilasa de lípido A.

[0023] En otra forma de realización la presente divulgación consta de una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido mostrando al menos un 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99% de identidad de aminoácido con SEC ID nº 1. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención muestra al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99% de identidad con la secuencia de ácido nucleico según SEC ID N°2 o SEC ID nº 3, los genes de PagL de *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* respectivamente. La secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia codificante de longitud completa o puede tener partes codificantes o no codificantes (o complementarias), fragmentos o incluso oligonucleótidos derivados de la misma.

[0024] La divulgación consta además de vectores de ADN que comprenden las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o polipéptidos codificantes que muestran al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99% de identidad de aminoácido con SEC ID nº 1. Los vectores de ADN de acuerdo con la invención pueden ser cualquier vector conocido en la técnica, como por ejemplo pero no limitándose a: plásmidos, fagos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales, vectores para la integración (homóloga) genómica. Los vectores pueden contener marcadores, tales como marcadores seleccionables, dotando de resistencia antibiótica, etiquetas fluorescentes, etiquetas moleculares etc. Los métodos para la clonación de ácido nucleico y expresión de proteínas codificadas de acuerdo con la invención son conocidas por el experto en la materia y pueden por ejemplo encontrarse en Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 1989 y Ausubel F. et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, 2004. Preferiblemente el vector de acuerdo con la presente divulgación es un vector donde la secuencia de ácidos nucleicos se encuentra operativamente enlazada a secuencias reguladoras tales como promotores, potenciadores y terminadores, dotando de expresión del gen y traduciendo al mensajero en la proteína 3-O-deacilasa del lípido A. De la forma más preferible el vector es capaz de conferir expresión y actividad de 3-O-deacilasa del lípido A a una célula huésped bacteriana de Gram negativa, opcionalmente en una forma inducible, por ejemplo mediante el promotor *tac* inducible en el plásmido pMMB67.

[0025] La divulgación también proporciona anticuerpos capaces de unirse al polipéptido de acuerdo con SEC ID N°1. Los anticuerpos de acuerdo con la divulgación pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales, cultivados en un huésped por la inyección de polipéptidos de acuerdo con la divulgación mostrada en los ejemplos. Los anticuerpos pueden utilizarse con el fin de establecer un diagnóstico, por ejemplo para analizar la expresión de proteínas PagL y mutaciones u homólogos del mismo en bacterias Gram negativas. Los anticuerpos pueden también utilizarse para el aislamiento y/o purificación de proteínas mostrando una actividad de 3-O-deacilasa de lípido A.

[0026] En otro aspecto la invención se refiere a bacterias Gram negativas que constan de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o codifican una molécula de polipéptido de acuerdo con la invención. Preferiblemente la molécula de ácido nucleico es comprendida por un vector de ADN de acuerdo con la invención, proporcionando expresión a la proteína codificada en células bacterianas Gram negativas y una fuente de actividad de 3-O-deacilasa de lípido A a la célula. Preferiblemente dicha bacteria Gram negativa es una bacteria que no comprende en su genoma un gen que codifica una proteína funcional mostrando una actividad de 3-O-deacilasa de lípido A tal como una proteína con una identidad significativa (>40 por ciento) con una proteína PagL como en la SEC ID nº 1. De la forma más preferible, el proporcionar una fuente de actividad de 3-O-deacilasa de lípido A alterará la composición de los LPS en la membrana externa de la pared celular de la célula bacteriana Gram negativa. La bacteria Gram negativa a ser proporcionada con una fuente de actividad de 3-O-deacilasa de lípido A también puede ser una bacteria que conste de un gen no funcional, teniendo una homología importante con una secuencia de ácido nucleico como la proporcionada en las SEC ID N° 2 o 3, por ejemplo por mutación, desplazamiento del marco de lectura o eliminación, tal como *Bordetella pertussis*.

[0027] No obstante, también puede proporcionarse con una fuente adicional para dicha actividad dentro del objeto de la presente invención una bacteria Gram negativa que consta de un gen (parcialmente) funcional en su genoma que codifique una proteína teniendo una actividad de 3-O-deacilasa de lípido A. Las bacterias Gram negativas pueden tener un nivel determinado de actividad de 3-O-deacilasa de lípido A pero dicha actividad debe ser mejorada proporcionando expresión adicional y/o mejorada de un polipéptido de acuerdo con la divulgación. Preferiblemente esto dará como resultado un aumento temporal o permanente en la actividad de la 3-O-deacilasa del lípido A en la bacteria hasta tal punto que el lípido A y/o la composición de LPS de la bacteria se encontrará temporal o permanentemente alterada o modificada, en comparación con la bacteria de tipo salvaje. Tal bacteria Gram negativa puede por ejemplo ser una *Bordetella Parapertussis* o una bacteria *Bordetella bronchiseptica*, pero puede elegirse cualquier otra bacteria Gram

negativa, preferiblemente una bacteria Gram negativa patógena, como por ejemplo *Neisseria* spp., como por ejemplo *N.meningitidis*, *N.gonorrhoeae*, *N.lactamica*.

[0028] Una bacteria Gram negativa de acuerdo con la invención que consta de actividad de 3-O-deacilasa del lípido A o de niveles elevados de actividad de 3-O-deacilasa de lípido A preferiblemente consta al menos de un lípido A parcialmente 3-O-desacetilado y/o especies de LPS en la membrana externa de la pared celular bacteriana. De forma alternativa la bacteria Gram negativa de acuerdo con la divulgación puede comprender especies de LPS o lípido A que conlleven una modificación secundaria tras la 3-O-desacilación del lípido A, tal como palmitoilación, desfosforilación o cualquier otra modificación secundaria tras la 3-O-desacilación del lípido A. La célula bacteriana de acuerdo con la divulgación puede comprender al menos el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de su LPS/lípido A total en una forma 3-O-desacetilada, o puede comprender alternativamente al menos el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de su lípido A/LPS en una forma que conlleva una modificación secundaria, tal como por ejemplo pero no limitándose a palmitoilación o desfosforilación.

[0029] En otro aspecto de la presente invención se proporcionan métodos para la producción de LPS parcialmente 3-O-desacetilados. En una primera forma de realización, tal método comprende un proceso de cultivo de bacterias Gram negativas de acuerdo con la invención bajo condiciones propicias para la síntesis de los LPS dactilados y, opcionalmente, la recuperación de los LPS desacetilados. Los métodos para el cultivo de varias bacterias Gram negativas se conocen en la técnica y pueden encontrarse por ejemplo en *Methods for General and Molecular Bacteriology*. P. Gerhardt et al., Eds. American Society for Microbiology, Washington DC, 1994. Los métodos para la recuperación, aislamiento y/o purificación de LPS son también conocidos en la técnica (*Meningococcal Vaccines*, *Methods and Protocols*. A.J. Pollard and M.C.J. Maiden, Eds. Capítulo 12: Construction of LPS mutants, pp.155-165. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 2001) y pueden por ejemplo realizarse de acuerdo con los ejemplos proporcionados en la presente especificación.

[0030] Alternativamente la presente invención proporciona un método para la producción *in vitro* de LPS al menos parcialmente 3-O-desacetilados o lípido A, constando el método de fases para proporcionar una composición que consta de LPS o lípido A en crudo o en forma (parcialmente) purificada y para poner esta composición en contacto con un polipéptido o proteína de acuerdo con la divulgación bajo condiciones propicias para la 3-O-desacilación enzimática *in vitro*. Tales condiciones pueden ser encontradas en la presente especificación, en el ejemplo 9 y en la sección de métodos.

[0031] En otra forma de realización la presente divulgación proporciona composiciones constando de al menos LPS parcialmente 3-O-desacetilados y/o lípido A, preferiblemente comprendiendo al menos el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento del total de LPS o lípido A en su forma 3-O-desacetilada o en otra forma que conlleve una modificación secundaria tras la 3-O-desacilación, tal como una forma palmitoilada.

[0032] Las composiciones de acuerdo con la divulgación, constando de LPS parcialmente 3-O-desacetilados y/o lípido A y opcionalmente conllevando modificaciones secundarias, bien comprendidas en la membrana externa de la pared celular de las células bacterianas, o en formas purificadas o crudas, pueden utilizarse para la producción de composiciones farmacéuticas. En una forma de realización particularmente preferible, tales composiciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación pueden ser composiciones adecuadas para fines de vacunación. Tales composiciones farmacéuticas son capaces de suscitar una respuesta inmune en un organismo huésped, preferiblemente un mamífero, de forma más preferible un humano, contra una bacteria Gram negativa. La presencia de al menos LPS parcialmente 3-O-desacetilados y/o lípido A o alternativamente LPS que conlleven modificaciones secundarias tras la 3-O-desacilación, proporciona diferentes beneficios, tales como el beneficio de una toxicidad, número y gravedad reducidos de los efectos secundarios en el sujeto y una dosis tolerada más alta para la composición en el sujeto a ser tratado o vacunado. La composición farmacéutica puede contener 1 o más excipientes y/o adyuvantes. Son conocidos en la técnica los adyuvantes y excipientes farmacéuticamente aceptables y pueden ser libremente elegidos por el experto en la materia, por ejemplo a partir de: *Current protocols in Immunology*, Wiley Interscience 2003 o *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Company, 1990.

[0033] En una primera forma de realización la composición farmacéutica puede ser una vacuna de células enteras, que conste de células bacterianas vivas o vivas atenuadas o células bacterianas no viables, las cuales deben haberse inactivado por congelación, tratamiento térmico, interrupción mecánica, tratamiento químico u otros métodos conocidos en el área de la farmacia y la vacunación (J.L. Pace, H.A. Rossi, V.M. Esposito, S.M. Frey, K.D. Tucker, R.I. Walker. Inactivated whole-cell bacterial vaccines: current status and novel strategies. *Vaccine* 16: 1563-1574 (1998)). Preferiblemente la célula bacteriana es una célula bacteriana patógena Gram negativa, de forma más preferible la célula bacteriana es de los géneros *Bordetella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Escherichia*, *Proteus* y de la forma más preferible es *Bordetella pertussis*, *Bordetella Parapertussis* o *Bordetella bronchiseptica*.

[0034] En una segunda forma de realización preferible, la composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación puede ser una vacuna acelular, que conste de 1, 2, 3 o más componentes inmunogénicos de las bacterias patógenas Gram negativas y que conste de al menos LPS parcialmente 3-O-desacetilados o lípido A, o los mencionados LPS que conlleven modificaciones secundarias tras la 3-O-desacetilación. Preferiblemente el lípido A parcialmente 3-O-desacetilado y/o los LPS son obtenidos a partir de una célula bacteriana Gram negativa patógena de acuerdo con la invención, donde preferiblemente la célula bacteriana es del género *Bordetella*, y de la forma más preferible es *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* o *Bordetella bronchiseptica*. Al menos el lípido A parcialmente 3-O-desacetilado y/o los LPS, opcionalmente conllevando modificaciones secundarias tras la desacetilación, pueden utilizarse con el fin de suscitar una respuesta inmune protectora contra la bacteria que la produce, pero puede utilizarse también alternativamente y mezclarse con otras composiciones para su utilización como sustancia adyuvante apropiada. Los LPS son conocidos en la técnica por ser un adyuvante apropiado para su utilización con fines de vacunación, activando receptores de tipo Toll y estimulando una respuesta inmunitaria innata. De acuerdo con la invención, los LPS parcialmente 3-O-desacetilados y al menos parcialmente detoxificados y/o lípidos A retienen en gran medida esta actividad (adyuvante) de estimulación inmunitaria, a la vez que causan una menor toxicidad relacionada con efectos secundarios adversos tales como inflamación local, rojez, dolor y fiebre.

[0035] Deben utilizarse composiciones farmacéuticamente aceptables y vacunas de acuerdo con la divulgación en métodos para el tratamiento de sujetos que padecen o sufren riesgo de padecer una infección bacteriana patógena de Gram negativas, constando la administración de la composición farmacéutica de una vacuna de células enteras o una vacuna acelular de acuerdo con la divulgación. Es conocido el uso de adyuvantes específicos, las cantidades absolutas y relativas de sustancias en las composiciones y el régimen de dosis para la administración o bien pueden ser determinados por el experto en la materia y pueden ser adaptados a las circunstancias propias de la infección patógena en particular o el estado del sujeto a ser tratado en particular. El régimen de dosis pueden constar de una única dosis pero también puede constar de múltiples dosis, por ejemplo de dosis de refuerzo, y pueden administrarse por vía oral, intranasal o parenteral. Los regímenes formados por varias dosis con fines de vacunación son conocidos en la técnica y pueden ser adecuadamente adaptados por el experto en la materia.

Leyendas de la figura
[0036]

Fig. 1. Arquitectura del lípido A. A, El lípido A de *E. coli* consiste en un disacárido de glucosamina bifosforilado sustituido con cuatro fracciones de R-3-hidroximiristoilo, de las que se esterifican las cadenas de ácido graso 2' y 3' con laurato y miristato respectivamente. B, Modificaciones reguladas de Lípido A de *Salmonella*. La sustitución de las fracciones de fosfato con L-Ara4N o pEtN es mediada por ArnT y PmrC; respectivamente, la formación de un lípido A modificado con 2-hidroximiristato por LpxO, la adición de una cadena secundaria de palmitoilo a la posición 2 por PagP, y la eliminación de la fracción de 3-hidroximiristoilo a la posición 3 por PagL.

Fig.2 Alineamiento de secuencias múltiples de proteínas PagL. Las secuencias fueron alineadas utilizando ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). Los guiones indican los gaps introducidos para un alineamiento óptimo. Los residuos absolutamente conservados se marcan con asteriscos. Se indican con dos puntos y puntos aquellos residuos fuerte y débilmente conservados respectivamente. El ORF de la PagL en *B. pertussis* se vio interrumpido por un desplazamiento del marco de lectura, que fue restaurado para dicho alineamiento añadiendo dos nucleótidos en el codón 33. Los números de registro de la proteína GenBank para los homólogos de la PagL son: *S. Typhimurium* AAL21147, *B. bronchiseptica* NP_890306, *B. parapertussis* NP_885487, *B. Pertussis* BX470248[§], *P. aeruginosa* NP_253350, *P. fluorescens* NZ_AAAT03000006[§], *P. putida* NC_002947[§], *P. syringae* ZP_00125465, *B. fungorum* NZ_AAAJ03000003[§], *B. mallei* NC_002970[§], *B. pseudomallei* NC_002930[§], *R. metallidurans* ZP_00274744, *R. solanacearum* NP_522762, y *A. vinelandii* ZP_00089534. El símbolo § indica los números de registro de GenBank de genomas enteros (incompletos), en los que se identificó manualmente a los homólogos de la PagL.

Fig. 3. Expresión y localización de membrana de la PagL en *E. coli* BL21 Star™ (DE3). Las membranas de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) que contienen pET-11a vacío o plásmidos de la pPagL se aislaron y analizaron mediante SDS-PAGE. Las proteínas se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue. Los asteriscos indican las bandas que fueron sometidas a microsecuenciación y que resultaron corresponder con proteínas de PagL maduras. La banda indicada por el asterisco doble corresponde a la proteína precursora PagL(BB). Las proteínas de peso molecular estándar se encuentran presentes en el lado izquierdo.

Fig. 4. Análisis por Tricina-SDS-PAGE de modificación de LPS *in vivo*. Las células *E. coli* BL21 Star™ (DE3) en crecimiento exponencial que contienen pET-11a o constructos de pPagL fueron inducidas con IPTG durante el tiempo indicado, tras el cual se recogieron y analizaron muestras de cultivo 1 OD₆₀₀ de la unidad mediante Tricina-SDS-PAGE.

Fig. 5. Análisis de GC/MS de tipo salvaje y LPS de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) modificados por PagL. Análisis de GC/MS de LPS de tipo salvaje (TS) de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) purificado, LPS (L_(St)) modificado por PagL(St), LPS (L_(Bb)) modificado por PagL(Bb), y LPS (Pa) modificado por PagL (Pa) (t= tiempo tras la inducción). Se indican las proporciones de C14/C14-30H normalizadas con LPS de tipo salvaje establecidas en 100 (los valores de muestran en las barras de arriba).

Fig. 6. Análisis estructural por ESI-MS de LPS de tipo salvaje y LPS de *E. coli* BL21 Star™ modificado por PagL. Se analizaron por ESI-MS las especies de lípido A a partir de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) de tipo salvaje que contienen pET-11a (A) vacío, y las especies de lípido A modificadas por PagL_(St) (B), PagL_(Pa) (C), y PagL_(Bb) (D). Los mayores valores en m/z 1797, 1928, 1622, y 1490 se interpretaron como las especies características de bifosfonato hexa-acilado que se encuentran típicamente en *E. coli*, especies de bifosfonato hexa-acilado sustituidas con una fracción de L-Ara4N, especies de monofosfato 3-O-desacilado sustituidas con una fracción de L-Ara4N, y especies de monofosfato 3-O-desacetilado, respectivamente. Los mayores picos en m/z 1716 y 1847 probablemente representan fragmentos iónicos de las especies en m/z 1797 y 1928.

Fig. 7. Remodificación in vivo de LPS desacetilados y el papel del endógeno de PagP. A, Células *E. coli* BL21 Star™ (DE3) en crecimiento exponencial que contenían el vector pET-11 vacío o el plásmido de pPagL_(Bb) se indujeron con IPTG durante el tiempo indicado. Las muestras que se corresponden con la unidad 1 OD₆₀₀ fueron recogidas y analizadas mediante Tricina-SDS-PAGE. B y C, el contenido de ácido graso de los LPS de tipo salvaje (TS) de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) purificado y los LPS (L_(Bb)) modificados por PagL_(Bb), aislados en el tiempo indicado tras la inducción de la expresión de PagL, que se analizaron mediante GC/MS. Se indican los C14/C14-3OH (B) normalizados y las proporciones de C16/C14 (C) con LPS de tipo salvaje establecidos en 100 (los valores de muestran en las barras arriba). D, Crecimiento exponencial de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) de tipo salvaje o *E. coli* BL21 Star™ (DE3) y el mutante derivado JG101 de itspagP, conteniendo pPagL_(Pa), fueron inducidos con IPTG durante el período de tiempo indicado, tras lo cual se recogieron muestras de cultivo de la unidad 1 OD₆₀₀ en gel de Tricina-SDS-PAGE.

Fig. 8. Modelo de topología para la PagL de *P. aeruginosa*. Se construyó un modelo para la topología de la PagL_(Pa) utilizando las reglas generales de la arquitectura de la membrana externa de la proteína como se describe en (44). El modelo propuesto consiste en un β-barril de ocho hebras con cuatro bucles (L1-4) extendiéndose en el entorno externo. Los residuos en las β-hebras postuladas se muestran con rombos, que se sombrean para los residuos expuestos a las bicapas del lípido. His₁₄₉ y Ser₁₅₁ (marcados en rojo; posición en el precursor de la PagL_(Pa)) son absolutamente conservados (Fig. 2) y se sugiere que forman parte de una tríada catalítica "clásica" de una hidrolasa de serina. Los candidatos potenciales para el residuo de ácido de la tríada catalítica se indican en amarillo. Los números reflejan la posición de los residuos en la secuencia precursora.

Fig. 9. Identificación de residuos de sitio activo de la PagL_(Pa) por sustitución de aminoácidos. Las células *E. coli* BL21 Star™ (DE3) en crecimiento exponencial que contienen el vector pET-11a vacío, el plásmido de pPagL_(Pa), o los plásmidos mutantes de pPagL_(Pa) se indujeron con IPTG durante 75 min, tras los cuales se recogieron y analizaron muestras de cultivo de la unidad 1 OD₆₀₀ mediante SDS-PAGE seguidas de una inmunotransferencia con anticuerpos primarios contra la PagL_(Pa) (A) y mediante Tricina-SDS-PAGE para visualizar LPS (B).

Fig. 10. Modificación in vivo de LPS de *B. pertussis*. A, Los LPS de tipo salvaje de *B. pertussis* de la cepa Tohama llevando el plásmido pMMB67EH de PagL_(Bb) se aislaron y analizaron por Tricina-SDS-PAGE. B, el contenido de ácido graso de LPS de tipo salvaje (TS) de *B. pertussis* de la cepa Tohama purificado, y los LPS (PagL) modificados con PagL_(Bb) fueron analizados mediante GC/MS. Se indica la proporción de C14-30H/C10-30H normalizado con LPS tipo salvaje establecido en 100 (valores mostrados en las barras arriba).

Fig. 11. Actividad biológica de los LPS aislados. Inducción de IL-6 (A) o IL-10 (B) en células MM6 por LPS purificados. Los ejes horizontales muestran la concentración de LPS en mg/ml y los verticales la lectura de ELISA en 450 nm.

Fig. 12. Modificabilidad térmica de la PagL_(Pa) (-) purificados y replegados analizados mediante SDS-PAGE seminativo. Se tiñó gel de SDS-PAGE con Coomassie Brilliant Blue mostrando la modificabilidad térmica de la PagL_(Pa) (-) purificado y replegado. Las muestras se trataron en el buffer de muestra conteniendo un SDS de 0,1% a temperatura ambiente (RT) o SDS de 2% SDS a 100°C (15 min), anterior a la electroforesis. Las proteínas de peso molecular estándar se encuentran presentes en el lado izquierdo.

Fig. 13. Modificación in vitro por unión de membrana o repliegue in vitro de la PagL. Los geles de Tricina-SDS-PAGE teñidos con plata muestran actividad in vitro de la PagL. A, LPS de *N. meningitis* L3 purificados se incubaron en un tampón con detergente durante 18 h a 37°C con o sin envolturas celulares obtenidos a partir de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) conteniendo pET-11a vacío, o plásmidos de la pPagL. B, Se incubaron LPS de *N. meningitis* L3 purificados en un tampón con detergente en ausencia o presencia de 5 mM de EDTA durante 18 h a 37°C con o sin 4 µg de PagL_(Pa)

replegado *in vitro* sin secuencia señal (PagL_(Pa) (-)). Se cargaron cantidades similares de mezclas de ensayo en todas las líneas.

Fig 14. Análisis por Tricina-SDS-PAGE de modificación de LPS *in vivo*. Se aislaron los LPS de tipo salvaje y el PagP/PagL expresando *B. pertussis* de la cepa Tohama por una extracción de agua/fenol caliente y se analizaron mediante Tricina-SDS-PAGE.

Fig. 15. Análisis estructural por ESI-MS de LPS de tipo salvaje y *B. pertussis* modificada por PagL/PagP. Se analizaron mediante ESI-MS las especies de lípidos A de *B. pertussis* de la cepa Tohama de tipo salvaje (A), y las especies de lípido A modificadas por PagL_(Bb) (B); PagP_(Ec) (C), y PagP_(Bp) (D). Los mayores picos en *m/z* 1557, 1477, 1387, 1307, 1251, y 1081 se interpretaron como las especies características de bifosfonato penta-acilado que se encuentra típicamente en *B. pertussis*, las especies correspondientes a monofosfato penta-acilado, las especies de lípido A desacetilado del ión molecular en *m/z* 1557 faltando el residuo primario de ácido 3-hidroxicadecanoico en la posición 3, las especies de lípido A del ión molecular en *m/z* 1477 faltando el residuo primario de ácido 3-hidroxicadecanoico en la posición 3, las especies de lípido A desacetilado del ión molecular en *m/z* 1477 faltando un residuo primario de ácido 3-hidroxitetradecanoico, y las especies de lípido A desacetilado del ión molecular en *m/z* 1477, faltando el residuo primario de ácido 3-hidroxicadecanoico en la posición 3 y un residuo primario de ácido 3-hidroxitetradecanoico, respectivamente. Los picos en *m/z* 1320, 1490, 1545, 1625, 1715, y 1796 corresponden a la palmitoilación mediada por PagP de los iones moleculares presentes en *m/z* 1081, 1251, 1307, 1387, 1477, y 1557, respectivamente.

Ejemplos

Procedimientos Experimentales

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

[0037] Son descritas todas las cepas bacterianas usadas en el presente estudio en la Tabla I. Típicamente, las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* se cultivaron a 37°C en agar de caldo de Luria-Bertani modificado, denominado LB agar (26), o en caldo LB, mientras se agitaba a 200 r.p.m. Para *E. coli*, el medio fue suplementado con 0,2% de glucosa. Cuando se consideró apropiado, se cultivaron bacterias en presencia de 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de canamicina, 50 µg/ml de ácido naladixico, o 100 µg/ml estreptomycin, para el mantenimiento del plásmido o la selección de cepa. Se cultivó *S. Typhimurium* SR11 en las placas de LB agar a 37°C. Se cultivaron cepas de *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* a 35°C en agar de Bordet-Gengou (Difco) suplementadas con 15% de sangre de oveja desfibrinada. Para inducir la expresión del gen de la pagL(Bb) en *B. pertussis*, las bacterias se cultivaron en el medio sintético Thijs (48) suplementadas con 1 mM de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) (concentración final) a 35°C, mientras se agitaba (180 r.p.m.).

TABLA 1: Cepas bacterianas y plásmidos usados en el presente estudio

Cepa o plásmido	Genotipo o descripción	Fuente o referencia
Cepas		
<i>B. bronchiseptica</i>		
B505	Cepa de tipo salvaje	N.V.I. ^a
<i>B. pertussis</i>		
B509	Cepa holandesa de la vacuna	N.V.I. ^a
B134	Cepa holandesa de la vacuna	N.V.I. ^a
Tohama	Cepa de tipo salvaje	NaI ^R Strep ^R 36
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO25	PAO1 <i>leu arg</i>	45

ES 2 493 440 T3

S. Typhimurium			
SR11	Cepa de tipo salvaje		46
<i>E. coli</i>			
TOP10F'	<i>F'</i> (<i>lacI</i> ^R <i>Tn10</i> (<i>Tet</i> ^R)) <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>		Invitrogen
DH5 α	<i>F</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>thi-1 hsdR17 gyrA96 recA1 endA1 supE44 relA1 phoA</i> Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15		47
BL21 Star TM (DE3)	<i>F ompT hsdS B (rB⁻ mB⁻) gal dcm rne131 (DE3)</i>		Invitrogen
SK2257	<i>F crcA280::Tn10^C thyA6 rpsL120(Str^R) deoCI</i>		CGSC ^b
JG101	BL21 Star TM (DE3) <i>crcA280::Tn10^C</i>		Este estudio
SM10	RP4-2-Tc::Mu <i>recA</i> Km ^R		50
Plásmidos			
pCRH-TOPO	Vector de clonación de <i>E. coli</i> Amp ^R Kan ^R		Invitrogen
pET-11a	Vector de expresión de <i>E. coli</i> con copia de alta fidelidad, Amp ^R , promotor T7		Novagen
pMMB67EH	Vector de amplio espectro de hospedador, Amp ^R , promotor <i>tac</i>		51
pMMB67EH	Vector de amplio espectro de hospedador, Amp ^R , promotor <i>tac</i>		51
pMMB67-PagL _(Bb)	Derivativo de pMMB67 albergando <i>B. bronchiseptica pagL</i>		Este estudio
pPagL _(Pa)	Derivativo de pET-11a albergando <i>P. aeruginosa pagL</i>		Este estudio
pPagL _(Bb)	Derivativo de pET-11a albergando <i>B. bronchiseptica pagL</i>		Este estudio
pPagL _(St)	Derivativo de pET-11a albergando <i>S. Typhimurium pagL</i>		Este estudio
pPagL _(Pa) (-)	Derivativo de pET-11a codificando <i>P. aeruginosa pagL</i> sin secuencia de señal		Este estudio
pPagL _(Pa) (H81A)	pPagL _(Pa) PagL _(Pa) codificante	Con sustitución de H81A	Este estudio
pPagL _(Pa) (H81N)	pPagL _(Pa) PagL _(Pa) codificante	Con sustitución de H81N	Este estudio
pPagL _(Pa) (S84A)	pPagL _(Pa) PagL _(Pa) codificante	Con sustitución de S84A	Este estudio
pPagL _(Pa) (S84C)	pPagL _(Pa) PagL _(Pa) codificante	Con sustitución de S84C	Este estudio
pPagL _(Pa) (H149A)	pPagL _(Pa) PagL _(Pa) codificante	Con sustitución de H149A	Este estudio
pagL _(Pa) (S151A)	pPagL _(Pa) PagL _(Pa) codificante	Con sustitución de S151A	Este estudio
pPagL _(Pa) (S151C)	pPagL _(Pa) PagL _(Pa)	Con sustitución de S151A	Este estudio

codificante
^a Netherlands Vaccine Institute, Bilthoven, Holanda
^b E. coli genetic stock center, Universidad Yale, New Haven (CT) ^c <i>pagP</i> también se conoce como <i>crac</i>

[0038] Se aisló el plásmido de ADN utilizando el sistema Promega Wizard® Plus SV Minipreps. Se utilizaron fosfatasa alcalina de intestino de ternera y endonucleasas de restricción siguiendo las instrucciones del fabricante (Fermentas). Los fragmentos de ADN se aislaron de geles de agarosa utilizando el kit de extracción rápida de gel Qiagen. Se realizaron ligaduras con la utilización del kit de ligadura rápida de ADN (Roche).

[0039] Los genes de la PagL de *S. Typhimurium* SR11 (*pagL*_(St)), *B. bronchiseptica* B505 (*pagL*_(Bb)), y el gen de la PagL, con o sin su parte de codificación de secuencia de señal, de *P. aeruginosa* PAO25 (*pagL*_(Pa); *pagL*_(Pa) (-)) fueron clonados en pET- 11a (Novagen) tras el promotor T7. Los genes fueron amplificados por PCR usando ADN cromosómico como modelo. El modelo ADN se preparó por resuspensión de ~10⁹ bacterias en 50 µl de agua destilada, tras la cual la suspensión fue calentada durante 15 min a 95°C. La suspensión se centrifugó luego durante 1 min a 16,100x g, después de lo cual el sobrenadante se usó como modelo de ADN. Las secuencias de los cebadores directos, que contenían un sitio *NdeI* (subrayado), incluyendo un codón de inicio ATG, fueron 5'-AACATATGAAGAGAATATTTATATATC-3' (*pagL*_(St)), 5'-AACATATGAAGAACTACTTCCGCTGG- 3' (*pagL*_(Pa)), 5'-AACATATGGCGGACGTCTCGGCCGCCG-3' (*pagL*_(Pa) (-)), y 5'-AACATATGCAATTTCTCAAGAAAAACA- 3' (*pagL*_(Bb)). Las secuencias de los cebadores inversos, que contenían un sitio de *BamHI* (subrayado) incluyendo un codón de terminación, fueron 5'-AAGGATCCTCAGAAATTATACTAATT-3' (*pagL*_(St)), 5'-AAGGATCCTTAGATCGGGATCTTGTAG-3' (*pagL*_(Pa)), *pagL*_(Pa)(-), y 5'-AAGGATCCTCAGAACTGGTACGTATAG-3' (*pagL*_(Bb)). Los PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 50 µl volumen total de reacción, 25 pmol de cada cebador, 0,2 mM dNTPs, 3 µl de solución de modelo de ADN, 1,5% dimetilsulfóxido, 1,75 unidades de enzima Expand High Fidelity mezclada con un tampón suministrado por el fabricante (Roche). El programa de temperatura fue de la siguiente manera: 95°C durante 3 min, un ciclo de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 1 min 30 s a 72°C repetido 30 veces, seguido de 10 min a 72°C y enfriamiento posterior a 4°C. Los productos PCR fueron purificados por gel de agarosa y posteriormente clonados en pCRII-TOPO. El ADN plásmido de los clones correctos fue digerido con *NdeI* y *BamHI*, y los fragmentos de PagL codificante se ligaron en *NdeI*/pET-11a digerido en *BamHI*. La ligadura-mezcla se usó para transformar *E. coli* DH5α utilizando el método CaCl₂ (27). El ADN plásmido de los transformantes fue controlado para la presencia de la PagL codificada correcta insertada por digestión con *NdeI* y *BamHI*. Los plásmidos que brindaron un perfil de digestión correcto fueron designados pPagL_(Pa), pPagL_(Pa) (-); pPagL_(Bb), y pPagL_(St) (tabla I). Las secuencias de codificación correctas de los genes *pagL* clonados fueron confirmadas por secuenciación nucleótida en ambas direcciones. Para subclonar el gen *pagL*_(Bb) en un amplio espectro hospedador, el vector pMMB67EH con copia de baja fidelidad, el ADN plásmido de pPagL_(Bb) se digirió con *XbaI* y *HinDIII*, y el fragmento codificante de PagL_(Bb) se ligó en pMMB67EH *XbaI* digerido por *HinDIII*. La mezcla de la ligadura fue usada para transformar DH5α de *E. coli*. El ADN plásmido de los transformantes fue controlado por la presencia del correcto codificante PagL insertándose por digestión con *XbaI* y *HinDIII*. Un plásmido que brindó un perfil correcto de digestión se designó como pMMB67EH- PagL_(Bb) (tabla I). El último plásmido fue usado para transformar SM10 de *E. coli*, que permitió posteriormente la transferencia de PagL_(Bb) pMMB67EH a *B. pertussis* por conjugación en el medio sólido descrito por Stibitz et al (52). Se introdujeron mutaciones en PagL usando el QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) y los cebadores catalogados en la tabla II. El pPagL_(Pa) plásmido fue usado como la plantilla donde se crearon las mutaciones. La presencia de las mutaciones correctas se confirmó por secuenciación nucleótida en ambas direcciones.

Tabla II

Cebadores utilizados para mutagénesis de sitio dirigido	
Nombre ^a	Secuencia (5'-3') ^b
H81A_FW	GAAGGCGCCGGCAAGGCGTCGCTGTCGTTGCT
H81A_REV	AGCGAACGACAGCGACGCCTTGCCGGCGCCTTC
H81N_FW	GAAGGCGCCGGCAAGAACTCGCTGTCGTTGCT
H81N_REV	AGCGAACGACAGCGAGTTCTTGCCGGCGCCTTC
S84A_FW	GGCAAGCATTGCTGGCGTTGCTCCGGTATTC
S84A_REV	GAATACCGGAGCGAACGCCAGCGAATGCTTGCC
S84C_FW	GGCAAGCATTGCTGTGCTTCGCTCCGGTATTC

S84C_REV	GAATACCGGAGCGAAGCACAGCGAATGCTTGCC
H149A_FW	GGCGTTCGGGCGATCGCGTATTCCAACGCCGGC
H149A_REV	GCCGGCGTTGGAATACGCGATCGCCCGAACGCC
H149N_FW	GGCGTTCGGGCGATCAACTATTCCAACGCCGGC
H149N_REV	GCCGGCGTTGGAATAGTTGATCGCCCGAACGCC
S151A_FW	CGGGCGATCCACTATGCGAACGCCGGCCTGAAA
S151A_REV	TTTCAGGCCGGCGTTGCATAGTGGATCGCCCG
S151C_FW	CGGGCGATCCACTATTGCAACGCCGGCCTGAAA
S151C_REV	TTTCAGGCCGGCGTTGCAATAGTGGATCGCCCG

^a El cebador aporta la sustitución de aminoácidos, p. ej. H81A_FW indica que el oligonucleótido mostrado se usó como cebador directo en un procedimiento de mutagénesis de sitio dirigido para sustituir la histidina de la posición 81 de la PagL_(Pa) precursor por una alanina.

^b Las mutaciones introducidas se encuentran subrayadas.

SDS-PAGE e inmunotransferencia

- 5 [0040] Se analizaron las proteínas por electroforesis en gel de sulfato-poliacrilamida de dodecilo de sodio (SDS-PAGE) (28), con 0,2% de SDS en el gel de funcionamiento, usando el equipo Bio-Rad Mini-PROTEAN®3. Se aplicaron las muestras a un 13% gel de poliácridamida con un 4% de gel de apilamiento y se sometieron a electroforesis a 150 V. Las proteínas se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue. Se utilizó Precisión Plus Protein™ manchado o sin mancha previa Standard de Bio-Rad para determinar la masa molecular relativa (M_r) Para la transferencia de Western, las proteínas se
- 10 transfirieron de los geles SDS-PAGE en membranas de nitrocelulosa. Las membranas se rellenaron durante toda la noche en tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,6), con 0,5% de leche en polvo sin grasas, 0,1% Tween-20 e incubado con anticuerpos primarios dirigidos contra la PagL(Pa) en el tampón de relleno, seguido por una incubación de anticuerpos anti conejillo de indias IgG conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (Sigma) en el tampón de relleno. Las manchas se desarrollaron con el uso de SuperSignal® WestPico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

SDS-PAGE semi-nativo

- 20 [0041] Las proteínas se analizaron por electroforesis en gel de sulfato-poliacrilamida de dodecilo de sodio (SDS-PAGE) (28), con 0,2% SDS en el gel de funcionamiento, usando el aparato Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3. Para el SDS-PAGE semi-nativo, no se añadió SDS al gel de funcionamiento o apilamiento, y las muestras no se calentaron antes de la electroforesis. Se aplicó a las muestras un 13% de gel de poliácridamida con un 4% de gel de apilamiento y se sometieron a electroforesis a 150 V. Para el SDS-PAGE semi-nativo, la electroforesis se realizó a una corriente constante de 15 mA en hielo. Las proteínas se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue. Se utilizó Precision Plus Protein™ Standard de Bio-Rad con y sin tinción previa con el fin de determinar la masa molecular relativa (M_r).

Tricina-SDS-PAGE

- 30 [0042] Se añadió en el tampón de muestra 0,5 mg/ml de proteinasa K (concentración final) a las muestras con LPS (28). Las muestras se incubaron durante 60 min a 55°C, seguidas de 10 min a 95°C para inactivar la proteinasa K. Las muestras se diluyeron luego 10 veces añadiendo un tampón de muestra, tras lo cual 2 µl de la muestra se aplicaron a un gel de Tricina-SDS-PAGE(30). Se permitió que el bromofenol se encontrara con el gel de separación a 35 V, después de lo cual el voltaje se aumentó a 105 V. Después de que la parte superior alcanzara la parte inferior del gel, se dejó a las muestras funcionando otros 45 min. Los geles se fijaron durante toda la noche en ácido de acético/etanol/agua 11:8:1 (v/v/v) y posteriormente se tiñeron con plata como es descrito (31).

Anticuerpos policlonales

- 40 [0043] Para la producción de anticuerpos, se utilizó pPagL(Pa) (-), para transformar *E. coli* BL21 Star™ (DE3) con el fin de permitir la expresión del gen de PagL truncado. La proteína de PagL(Pa), acumulada en los cuerpos de inclusión, fue aislada (29), purificada con una preparación de gel SDS-PAGE y utilizada para la inmunización de conejillos de Indias en

Eurogentec.

Microsecuenciación

[0044] Las proteínas se transfirieron desde los geles SDS-PAGE en una membrana Immobilon™-P de difluoruro de polivinilideno (Millipore Corp.) en 192 mM de glicina, 25 mM Tris (pH 8,3), 10% metanol (v/v) a 100 V durante 1 h utilizando el aparato Bio-Rad Mini-PROTEAN®. Tras la transferencia, la membrana se lavó 3 veces durante 15 min con agua destilada. Las proteínas transferidas se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue. La membrana se secó al aire, y las bandas del putativo de PagL fueron cortadas y sometidas a microsecuenciación en el Sequencing Center Facility, Universidad de Utrecht, Holanda. Aislamiento de LPS y análisis por Espectrometría de masa cromatografía de gas (GC/MS).

[0045] Los LPS fueron aislados utilizando el método de extracción de agua/fenol caliente (3). En poco tiempo, la *B. pertussis* de la cepa Tohama, con o sin el plásmido pMMB67EH de PagL_(Bb), fue cultivada en 3 litros de medio de Thijs (48) en presencia de 1 mM IPTG (concentración final). Se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en 40 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7.0) que contenía 5 mM de EDTA. Las células se trataron durante la noche con lisozima a 4°C, tras lo cual se añadió un volumen igual de fenol. La suspensión se calentó a 70°C y se incubó durante 30 minutos mientras se procedía a su agitación. La suspensión se enfrió a 10°C, tras lo cual las fases fueron separadas por centrifugado. La fase superior fue recogida y se repitió la extracción añadiendo un volumen igual de agua destilada a la fase inferior. Tras las posteriores incubación a 70°C, enfriamiento y centrifugado, las dos fases superiores se mezclaron y dializaron contra agua del grifo hasta que el fenol oloroso desapareció. Después de la liofilización de las fracciones dializadas, se disolvieron los LPS en la solución de tampón fosfato salino (pH 7.2) en una concentración de 1 mg/ml. Para analizar el ácido graso por GC/MS, se añadió un pliegue de cinco (v/v) excesos de acetona a una parte alícuota de los LPS aislados, tras lo cual la solución se secó a 60°C bajo un flujo de nitrógeno. Posteriormente, los 10 µg de C12:0(20H) (1 mg/ml en el etanol) se añadieron como estándar interno, al igual que 100 µl de cloruro de acetilo/etanol 1:9 (v/v), tras lo cual se derivatizaron las muestras 1 h a 90°C. Tras el enfriamiento, la reacción se detuvo añadiendo 200 µl de 1 M K₂HPO₄ (pH 8.0), seguido de la extracción de los ésteres acilo-etilo con 200 µl de acetato de etilo. Un volumen de 1-µl de la fase superior se usó para el análisis por GC/MS en una Finnigan MAT SSQ en el modo de impacto de electrones.

Actividad biológica de los LPS

[0046] La inducción de IL-6 e IL-10 por LPS de *B. pertussis* de la cepa Tohama de PagL modificada y de tipo salvaje se evaluó con la línea celular macrófaga humana MM6 (49). Las células MM6 se cultivaron en placas de microtitulación (2.10⁵/pocillo) en 400 µl de IMDM (Gibco BRL) suplementadas con 10% de suero fetal de ternera (Gibco BRL) y estimuladas con 200 µl de diluciones en serie de la solución madre de LPS, durante 16-18 h a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía 5% de CO₂. Los niveles de IL-6 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo se cuantificaron con ELISA contra IL-6 o IL-10 humano de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PeliPair™ reagent set, Sanquin Reagents, Amsterdam, Holanda).

Aislamiento de envolturas celulares

[0047] Las células fueron cosechadas por centrifugación durante 10 min a 1,500x g, y lavadas una vez en 50 ml de solución de 0,9% cloruro sódico frío. Los granulados celulares se congelaron al menos 15 min a -80°C, y luego se suspendieron en 20 ml de 3 mM de EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) que contenían cóctel inhibidor Complete Protease (Roche). Las células se interrumpieron por sonicación, tras lo cual las células ininterrumpidas se eliminaron por centrifugación durante 10 min a 1,500x g. Las envolturas celulares se granularon a partir del sobrenadante por centrifugado durante 1,5 h a 150,000x g y se resuspendieron en 2 mM Tris-HCl (pH 7,4). Las envolturas celulares se almacenaron a -80°C en partes alícuotas.

Aislamiento de cuerpos de inclusión

[0048] Para el aislamiento de cuerpos de inclusión, se expresó PagL_(Pa) (-) en *E. coli* BL21 Star™ (DE3) de pPagL_(Pa) (-) (tabla 1). Se realizó un cultivo de dos litros a 37°C en el medio LB suplementado con ampicilina hasta un OD₆₀₀ entre 0,4 y 0,6. Luego, se añadió 1 mM IPTG (concentración final) al cultivo para inducir expresión del gen recombinante, tras lo cual el cultivo fue además incubado a 37°C, mientras se agitaba. Tras 4 horas aproximadamente, las células se cosecharon por centrifugado (15 min a 4,000 r.p.m. (4°C)). Las células cosechadas se lavaron una vez en 400 ml 0,9% de NaCl y luego se resuspendieron en 80 ml TE 50:40 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM EDTA). Se añadieron sacarosa (0,25 g/ml (concentración final)) y lisozima (0,2 mg/ml (concentración final), tras lo cual se incubó la suspensión durante 30 min a RT, mientras se agitaba. La suspensión se sonizó tres veces en hielo (1,5 min, con pausas de 2 min entremedias) utilizando un Branson 250 Sonifier con macropunta (salida 9, ciclo de funcionamiento 50%). Se añadió la

siguiente sonicación, 0,13% (w/v) Brij-35P (Fluka), y la suspensión se sonicó durante dos minutos adicionales. El material denso (cuerpos de inclusión) se recogió por centrifugado durante 2 hrs a 4,000 r.p.m. (4°C), tras lo cual el granulado se lavó una vez en 40 ml TE 50:40, seguido de otro proceso de lavado usando 40 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8,3). Los cuerpos de inclusión obtenidos fueron solubilizados en 8 M de urea suplementada con 10 mM de glicina (pH 8,3) y precipitados con ATC. Finalmente, las proteínas obtenidas fueron solubilizadas en 8 M de urea suplementada con 10 mM de glicina (pH 8,3) en una concentración de proteínas de 10 mg/ml. Esta mezcla se centrifugó durante 2 hrs a 13,000 r.p.m. con el fin de eliminar el material insoluble residual y las membranas.

Replegado y purificación de la PagL_(Pa) (-)

[0049] Se replegó la PagL_(Pa) (-) *in vitro* por dilución dos veces de la solución de 10 mg/ml de proteína (ver arriba) en 10% (w/v) de óxido de lauril dimetilamina (LDAO) y con sonicación posterior durante 10 min. Se purificó el PagL_(Pa) (-) replegado por cromatografía en fase líquida de proteína rápida (FPLC) utilizando una columna de intercambio de iones MonoQ 1ml (Amersham Biosciences). La solución de proteína se diluyó 4 veces en el tampón A (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,08 % (w/v) C10 E5). La solución se cargó en la columna, que fue preequilibrada con el tampón A, y lavada una vez con tampón A, y las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 0-1 M NaCl en el tampón A. Se analizaron las fracciones con SDS-PAGE para la presencia de proteína PagL_(Pa) (-) replegada. Aquellas que contenían la proteína se agruparon y se concentraron en una concentración de proteínas de 10 mg/ml usando concentradores Centricon con un corte de masa molecular de 3 kDa (Amicon). La solución de proteínas se dializó en tres ocasiones durante toda la noche contra 10 ml 2 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,06% (w/v) C10 E5 utilizando una membrana con un corte de masa molecular de 3,5 kDa.

Ensayo de modificación *in vitro*

[0050] Se diluyó LA PagL_(Pa) (-) (10 mg/ml) replegado a o envolturas celulares aisladas de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) conteniendo el vector vacío de pET-11a o plásmidos de la pPagL 10 veces en el agua doblemente destilada. Se incubaron 4 µl de la proteína replegada diluida o una solución de envoltura celular en LPS de meningitis L3 de 50 mM Hepes (pH 8,0), 0,1% Triton X-100, 0,5 a X M NaCl, y 0,75 nmol/l en un volumen final de 10 µl a 37°C durante 16 h. Para probar si la reacción dependía de cationes bivalentes, se añadieron 5 mM de EDTA en la reacción con la PagL_(Pa) (-) replegada. Las reacciones se terminaron por ebullición en el tampón de muestra (28), tras lo cual las muestras se trataron con 0,5 mg/ml de proteinasa K durante 1 hora a 55°C, seguidos de una incubación de 10 min a 95°C. Las muestras se diluyeron 25 veces añadiendo un tampón de muestra, tras lo cual 2 µl de las muestras se analizaron por Tricina-SDS-PAGE (ver arriba).

Aislamiento de los LPS y análisis por Espectrometría de masa de ionización por electrospray (ESI MS)

[0051] Los LPS se aislaron utilizando el método de extracción de agua/fenol caliente (Westphal y Jann, Methods Carbohydr. Chem. 5,83-91,1965) con ligeras modificaciones. En poco tiempo, se cultivaron las bacterias en el medio de Tijs en presencia de 1 mM IPTG (concentración final) durante 64 h. Las células se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en 40 mM de tampón fosfato de sodio (pH 7,0) que contenía 5 mM de EDTA. Las células se trataron durante toda la noche con lisozima a 4°C, tras lo cual se añadió un volumen equivalente de fenol. La suspensión se calentó a 70°C, se incubó durante 30 min mientras se procedía a su agitación, y posteriormente se enfrió a 10°C, tras lo cual las fases fueron separadas por centrifugado durante 10 min a 8,000 x g. Se recogió la fase superior y se repitió la extracción tras añadir un volumen igual de agua destilada a la fase inferior. Las dos fases superiores fueron combinadas, dializadas contra agua del grifo hasta la desaparición del olor a fenol, liofilizadas y posteriormente recogidas en el agua destilada. Los LPS se granularon posteriormente por centrifugado durante 3 h a 150,000 x g y se disolvieron en el agua destilada, tras lo cual la concentración de LPS se determinó por el análisis del contenido de ácido 3-hidroxitetradecanoico, utilizando cromatógrafo de gases Agilent 6890, como es descrito (Welch, Clin. Microbiol. Rev. 1991)). Para ESI-MS, una parte alícuota de 200 µl de LPS aislados (50 nmol/ml) se liofilizó y se recogió en 0,1 ml de 2% de ácido acético. La mezcla fue calentada durante 2 h a 95°C para hidrolizar los LPS y liberar la fracción de lípido A. Posteriormente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 min a 16,100 x g. El granulado se lavó dos veces en 0,1 ml de agua doblemente destilada, absorbiéndose en 0,1 ml de agua doblemente destilada, y se añadieron 0,3 ml de metanol/cloroformo (2:1; v/v). Tras una agitación vigorosa las fases se separaron por centrifugado durante 10 min en 16,100 x g. La fase superior fue después usada para realizar un análisis estructural del lípido A purificado mediante una MS en tándem con una fuente de nanoelectrospray en un LCQ Finnigan en el modo de ión negativo (Wilm y Mann, Anal. Chem. 1996).

Ejemplo 1: Identificación de los homólogos de la PagL en varias bacterias Gram negativas

[0052] La secuencia del aminoácido 187 de la proteína precursora de PagL de *S. Typhimurium* (GenBank Accession

Number AAL21147, ID SEC N° 17) se usó como método que llevar a la identificación de homólogos putativos de la PagL en otras bacterias Gram negativas, mediante la búsqueda de todos los genomas completos e incompletos de bacterias Gram negativas presentes en la base de datos del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). La búsqueda con BLAST (34) reveló la presencia de homólogos putativos en las especies de *Bordetella B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, y *B. paraptussis* (Fig. 2). Los homólogos de la PagL de *B. bronchiseptica* y *B. paraptussis* son dos polipéptidos del aminoácido 187 mutuamente idénticos (Fig. 2) con, como fue pronosticado por el servidor de señal de péptidos (35), un péptido señal N-terminal de aminoácido 25. Se encontró también un gen para una PagL homóloga en el genoma de *B. pertussis* de la cepa Tohama (36), pero este marco abierto de lectura (ORF) se interrumpió por un desplazamiento del marco de lectura (SEC ID n° 4), que podría restaurarse como ID SEC n° 5 para codificar una proteína como en la SEC ID N°1. La secuenciación nucleótida de los marcos abiertos de lectura de la PagL de las cepas de *B. pertussis* B509 y B134 también mostró la presencia del mismo desplazamiento del marco de lectura, lo que indica que la interrupción del ORF de la PagL puede ser una característica común de las cepas de *B. pertussis*. Con el uso del recientemente identificado homólogo de la PagL de *B. bronchiseptica* como prueba para análisis adicionales con BLAST, se pudieron identificar los homólogos putativos de la PagL adicionales en los genomas de *P. aeruginosa* (SEC ID n° 6, identidad 30%), *Pseudomonas fluorescens* (SEC ID n° 7, identidad 29%), *Pseudomonas syringae* (SEC ID n° 8, identidad 31%), *Pseudomonas putida*, 2x (SEC ID n° 9 + 10, 32/33%), *Ralstonia metallidurans* (SEC ID n° 15, 28%), *Ralstonia solanacearum* (SEC ID n° 16, 29%), *Burkholderia mallei* (SEC ID n° 12, 28%), *Burkholderia pseudomallei* (SEC ID n° 13, 28%), *Burkholderia fungorum* (SEC ID n° 11, 29%), y *Azotobacter vinelandii* (SEC ID n° 14, 27%) Los alineamientos se muestran en la Fig. 2. Juntos, todos los homólogos de la PagL mostraron una identidad de secuencia mutua y generalmente baja, no obstante superior que con *S. typhimurium* (24% de identidad), pero conteniendo un dominio claro de homólogos cerca de la terminación C. Nuestro hallazgo sobre este asunto permitió la identificación de homólogos de la PagL en otras especies (bacterianas) y permitió el uso de un homólogo apropiado de la PagL para cualquier bacteria hospedadora y/o cualquiera de los LPS a ser 3-O-desacetilados.

Ejemplo 2: Clonación de la PagL y expresión heteróloga en *E. coli*

[0053] Para verificar la actividad de su putativo de lípido A-desacilasa, se clonaron los homólogos de la PagL de *P. aeruginosa* (pagL_(Pa)) y *B. bronchiseptica* (pagL_(Bb)). PagL_(St) es incluido en estos estudios como una referencia. Estos genes de PagL se amplificaron a partir de los cromosomas por PCR y finalmente se clonaron en un pET-11a bajo el control del promotor de T7, dando como resultado plásmidos, pPagL_(Pa), pPagL_(Bb), y pPagL_(St).

[0054] Para investigar la expresión y localización de la membrana de la PagL en *E. coli*, se cultivó durante toda la noche *E. coli* BL21 Star™ (DE3) conteniendo el vector vacío pET-11a o plásmidos de la pPagL en LB, tras lo cual se aislaron las envolturas celulares. El análisis por SDS-PAGE reveló la presencia de bandas adicionales prominentes con M_rs de 15000-18000 en las envolturas celulares de las células que expresaban la PagL (Fig. 3). Esto resultó coherente con las masas moleculares previstas de las proteínas maduras de PagL, es decir PagL_(Pa) 16.1 kDa, PagL_(Bb) 17.2 kDa, y PagL_(St) 18.2 kDa. Se sometieron a microsecuenciación con el fin de identificar las bandas proteicas adicionales. Las secuencias de los residuos de los 5 primeros aminoácidos de PagL_(Pa), PagL_(Bb), y PagL_(St) fueron ADVSA, QPTQG, y NDNVF, respectivamente, indicando que se da lugar una escisión del péptido señal por la peptidasa líder entre los residuos de los aminoácidos 23 y 24 (AQA-ADV), 25 y 26 (AQA-QPT), y entre 20 y 21 (CSA-NDN), respectivamente. Particularmente en el caso de la expresión de la PagL_(Bb), resultó visible en el gel una banda adicional con un M_r superior (Fig. 2). La secuencia N-terminal de esta banda, MQFLK, correspondió con la del precursor de la PagL_(Bb).

Ejemplo 3: modificación in vivo de LPS de *E. coli* por PagL

[0055] Para analizar si los homólogos clonados de la PagL se encontraban activos en LPS de *E. coli*, se añadió IPTG a las células *E. coli* BL21 Star™ (DE3) en crecimiento exponencial con el vector vacío pET-11a o los plásmidos de la pPagL, y tras varios periodos de incubación, las muestras equivalentes a una unidad OD₆₀₀ se recogieron y se analizó su contenido de LPS mediante Tricina- SDS-PAGE. De acuerdo con la hidrólisis prevista del R-3-hidroximiristato en la posición 3 del lípido A, la expresión de cualquiera de los tres homólogos de la PagL convirtió los LPS en una forma con una movilidad electroforética superior (Fig. 4). La conversión era casi completa 75 min después de la inducción de la PagL_(Pa) o la PagL_(Bb), pero tomó algo más de tiempo en el caso de la PagL_(St).

[0056] Análisis estructural de LPS modificados por PagL: para determinar su contenido de ácido graso, los LPS se aislaron de las bacterias que se cultivaron en presencia de 10 mM de MgCl₂ para regular las modificaciones reguladas por PhoP/PhoQ de lípido A y se analizaron por GC/MS. La proporción de C14:0/C14:0(3OH) en las muestras de LPS modificados por PagL aumentó cuando se comparó con aquellas de LPS de tipo salvaje (Fig. 5), de acuerdo con la eliminación prevista de un C14-3OH de lípido A. Para confirmar estos datos, las fracciones de lípido A se aislaron y fueron analizadas por ESI-MS en el modo de ión positivo, que reveló la presencia de cuatro especies principales de lípido A en los LPS de tipo salvaje (Fig. 6A). El valor máximo en m/z 1797 representa las especies características de bifosfato hexa-acilado que se encuentran típicamente en el *E. coli*, mientras que el valor máximo en m/z 1928

corresponde con una especie de bifosfato hexa-acilado sustituida por una fracción de L-Ara4N. Los dos picos restantes en m/z 1716 y m/z 1847 representan muy probablemente iones fragmentados de las dos especies anteriores faltando un grupo de fosfato. Sobre la expresión de la PagL_(St) (Fig. 6B), PagL_(Pa) (Fig. 6C), o PagL_(Bb) (Fig. 6D), las especies principales de lípido A estuvieron presentes en m/z 1622 y m/z 1490, lo cual se corresponde con la pérdida de un residuo de β -hidroximiristato y de un grupo de fosfato de las especies principales en m/z 1928 y m/z 1797 presentes en el control de vector vacío respectivamente. También aquí, la pérdida del grupo de fosfato es probablemente un artefacto del proceso de ionización. Basándose en los datos de GC/MS y ESI-MS, se puede concluir que los homólogos identificados de la PagL de *P. aeruginosa* y *B. bronchiseptica*, como el proveniente de *S. Typhimurium*, son desacilasas activas de lípido A. Además, los datos sugieren que la desacilación no depende de la ausencia o presencia de una fracción de L-Ara4N, dado que ambas especies se desacetilaron eficazmente.

Ejemplo 4: Resultados posteriores a la modificación de LPS desacilado por PagL in Vivo

[0057] En el curso de estos experimentos, se observó que tras la expresión prolongada de la PagL, los LPS modificados por PagL no pudieron volver a detectarse en los geles de Tricina-SDS-PAGE, y que los LPS migraron nuevamente a la posición de los LPS de tipo salvaje, como se ilustra para la cepa que expresa PagL_(Bb) (Fig. 7A). La proteína de PagL se encontraba aún presente abundantemente en este momento, como se revelaba en los geles de SDS-PAGE (datos no mostrados). Además, los análisis por GC/MS revelaron que la proporción de C14:0/C14: 0(3OH) no disminuyó de nuevo para los LPS aislados tras 5 h de inducción de la PagL_(Bb) (Fig. 7B). Así, la modificación secundaria observada en el gel de Tricina-SDS-PAGE (Fig. 7A) no era la consecuencia de la restauración de la modificación de la PagL, sino el resultado de (unas) modificación(es) adicional(es) que restauraron la movilidad electroforética a aquel LPS de tipo salvaje. Por ello, se compararon otras proporciones de ácido graso. Se encontró un sorprendente aumento en la proporción de C16:0/C14:0 en los LPS de células inducidas 5 h para la producción de la PagL (Fig. 7C), sugiriendo que los LPS de la PagL-desacilada fueron posteriormente palmitoilados.

[0058] Una proteína que añade palmitato al lípido A es la proteína de membrana externa de PagP (19) (Fig. 1). Por lo tanto, se da la hipótesis de que la modificación secundaria de los LPS modificados por PagL podrían ser el resultado de la actividad endógena de PagP. Para indagar en esta posibilidad, se transformó *E. coli* BL21 Star™ (DE3) de tipo salvaje y su mutante derivado de la PagP JG101 con el plásmido de pPagL_(Pa). La modificación secundaria de los LPS modificados por PagL se observó de nuevo en el caso de la cepa tipo salvaje, pero no en aquella cepa mutante (Fig. 7D). Este resultado sugiere fuertemente que la modificación secundaria de LPS modificados por PagL (Fig. 7A) fue por lo tanto la consecuencia de la actividad endógena de PagP.

Ejemplo 5: identificación de residuos de sitio activo de la PagL

[0059] La identidad de secuencia mutua entre el homólogo identificado de la PagL resulta muy bajo (Fig. 2). Entre los pocos residuos totalmente conservados se encuentran una histidina y una serina, que se cree pueden formar parte de una tríada catalítica 'clásica' de Asp/Glu-His-Ser de hidrolasas de serina. Estos residuos putativos de sitio activo se localizan en el lado expuesto a lípidos cercano a la parte superior de una β -hebra en un modelo topológico aquí propuesto (Fig. 8). En la membrana externa fosfolipasa A, interesantemente se observa que His y Ser se localizan en una posición similar (37). Para probar si estos residuos, localizados en las posiciones 149 y 151 de la proteína precursora de PagL_(Pa), respectivamente, son realmente importantes para la actividad catalítica, fueron sustituidos por alanina o asparagina, y por alanina o cisteína, respectivamente. Como forma de control, las mismas sustituciones se realizaron en histidina no conservada y en residuos de serina, localizados en las posiciones 81 y 84 del precursor de la PagL_(Pa), respectivamente. Se analizaron las proteínas y los perfiles de LPS de células *E. coli* BL21 Star™ (DE3) que transportan los plásmidos pertinentes y se indujeron durante 75 min con IPTG por inmunotransferencia (Fig. 9A) y Tricina-SDS-PAGE (Fig. 9B), respectivamente. Mientras que la sustitución del His81 no conservado y Ser84 no afectó a la desacilación de LPS, esta no volvió a observarse cuando el His149 conservado y Ser151 se sustituyeron (Fig. 9B), aunque la expresión de las mutaciones de estas proteínas no se vio afectada (Fig. 9A). Estos resultados apoyan considerablemente la hipótesis de que la histidina conservada en la posición 149 y la serina en la posición 151 de la proteína precursora de la PagL_(Pa) son residuos de sitio activo y que las funciones mecanicistas de la PagL son como una hidrolasa de serina.

Ejemplo 6: clonación de la pagL_(Bb) y de la expresión heteróloga en *B. pertussis*

[0060] Para modificar LPS de *B. pertussis* in vivo, se clonó el gen de PagL de *B. bronchiseptica* (pagL_(Bb)). El gen de la PagL se amplificó a partir del cromosoma por PCR y finalmente fue clonado en pMMB67EH bajo el control del promotor Tac, dando como resultado un plásmido, pMMB67EH-PagL(Bb), que fue transferido a la *B. pertussis* de la cepa Tohama por conjugación.

[0061] Para dirigir la modificación de LPS de *B. pertussis* in vivo, *B. pertussis* de la cepa Tohama de tipo salvaje, o la *B.*

pertussis de la cepa Tohama que contenía el plásmido pMMB67EH-PagL_(Bb) fueron cultivados en el medio de Thijs suplementados con 1 mM de IPTG (concentración final). Se aislaron los LPS por el método de extracción de agua/fenol caliente y se analizaron por Tricina-SDS-PAGE (Fig. 10A) y GC-MS (Fig. 10B). El análisis en el gel de Tricina-SDS-PAGE mostró que los LPS aislados de PagL_(Bb) expresaban una migración de la cepa ligeramente más rápida que cuando se comparaba con los LPS de tipo salvaje de *B. pertussis*. Sorprendentemente, los LPS aislados de la PagL_(Bb) que expresaban una cepa mostraron dos poblaciones de LPS diferentes. Una población migró cerca de la altura de los LPS de tipo salvaje de Tohama, y otra población migró más rápidamente. Esta última población de LPS puede también observarse en la preparación de LPS de tipo salvaje, no obstante la cantidad de los mismos es muy inferior. Para verificar que los LPS de la PagL con expresión de cepa fueron realmente desacetilados en su posición 3, se analizaron por medio de GC-MS. La proporción de C14:0(3OH)/C10:0(3OH) en la muestra de LPS modificados por PagL aumentó en comparación con aquella en los LPS de tipo salvaje (Fig. 10B), de acuerdo con la eliminación prevista de un C10-3OH de la posición 3 de lípido A de *B. pertussis*.

Ejemplo 7: actividad biológica de LPS de modificado por PagL

[0062] Para valorar la actividad endotóxica de los LPS modificados por PagL y de *B. pertussis* de tipo salvaje, se midió su capacidad para estimular la producción de IL-6 e IL-10 en la línea celular macrófaga humana MM6. Como se puede observar en la figura 2, para LPS de tipo salvaje, se incrementó la producción tanto de IL-6 (Fig. 11A) como de IL-10 (Fig. 11B) por las células MM6 en comparación con la estimulación de las células con una cantidad idéntica de LPS modificados por PagL. Así, se puede concluir que la desacilación *in vivo* de LPS de *B. pertussis* por los resultados de la PagL conlleva una reducción en la actividad endotóxica de estos LPS.

Ejemplo 8: clonación, expresión, purificación, y repliegue de la PagL_(Pa)

[0063] El gen PagL de *P. aeruginosa* PAO25 sin su secuencia de señal codificante fue clonado en pET- 11a, dando como resultado un plásmido de pPagL_(Pa) (-). Para obtener cuerpos de inclusión, se expresó la PagL sin su secuencia de señal en *E. coli* BL21 Star™ (DE3). Se aislaron y se solubilizaron los cuerpos de inclusión en urea, tras lo cual la proteína se replegó por la dilución dos veces en 10% de óxido de laurildimetilamina (LDAO) y se purificó además por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). El correcto repliegue fue confirmado por SDS-PAGE (Fig. 12) y mediciones de dicroísmo circular (CD) (datos no mostrados). En el gel de SDS-PAGE, la proteína replegada tenía una movilidad electroforética inferior en comparación con la forma desnaturalizada, mientras que las mediciones de CD mostraban que la proteína replegada tenía predominantemente conformación de β -lámina.

Ejemplo 9: modificación de LPS *in vitro* por PagL de membrana localizada y replegados

[0064] Para probar si la PagL localizada en la membrana o replegada *in vitro* era capaz de modificar LPS añadidos de manera externa *in vitro*, se incubaron pagL replegada (_{Pa}) (-), o envolturas celulares aisladas de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) que contenían el vector vacío pET-11a, o los plásmidos de pPagL, junto con LPS purificados de *N. meningitis*. La modificación de los LPS se evaluó por Tricina-SDS-PAGE (Fig. 13). De acuerdo con la hidrólisis prevista del R-3-hidroximiristato en la posición 3 del lípido A, los LPS se convirtieron en una forma con una mayor movilidad electroforética cuando se encontraban presentes o bien la PagL se encontraba localizada en la membrana (Fig 13A) o PagL_(Pa) (-) replegada (Fig 13B). La reacción con la PagL_(Pa) (-) replegada era independiente en presencia de cationes bivalentes, mientras que la desacilación de LPS se observaba aún en presencia de 5 mM EDTA (Fig. 13B).

Ejemplo 10: Estructura alterada de lípido A tras la expresión de PagP y PagL en *B. pertussis*

[0065] Para expresar PagP y PagL en *B. pertussis* de la cepa Tohama, el gen de la PagL de *B. bronchiseptica* (pagL_(Bb)) y el gen de PagP de *B. pertussis* (pagP_(Bp)) fueron expresados a partir del amplio espectro de hospedador del vector de expresión numérica pMMB67EH con copia de baja fidelidad. Como forma de control, se construyó también una cepa con expresión del gen de PagP de *E. coli* (pagP_(Ec)). Los LPS se aislaron de *B. pertussis* de la cepa Tohama de tipo salvaje, con expresión PagP, o con expresión de PagL y se analizaron por Tricina-SDS-PAGE. Los LPS aislados de la cepa con expresión PagL_(Bb) aparecieron sin resultar afectados en el gel, mientras que aquellos con expresión PagP aparecieron potencialmente modificados, ya que se detectó una banda con una movilidad electroforética inferior que la de los LPS de *B. pertussis* de tipo salvaje (Fig. 14). Además, en comparación con la cepa con expresión PagP_(Bp), apareció una mayor eficiencia de modificación en la cepa con expresión PagP_(Ec) (Fig. 14). Para evaluar las posibles modificaciones de LPS con mayor detalle, se analizaron las fracciones de lípido A de las cepas por ESI-MS en el modo de ión negativo. Este análisis reveló la presencia de cuatro especies principales de lípido A en el LPS de tipo salvaje (Fig. 15A). El valor máximo en *m/z* 1557 representa las especies características de bífosfato penta-acilado que se encuentran típicamente en *B. pertussis* (Caroff et al., Microbes. Infect., 1994), mientras que el valor máximo en *m/z* 1477 corresponde con las especies de monofosfato penta-acilado. Los dos picos restantes en *m/z* 1307 y 1251 representan especies de lípido A desacetiladas del ión molecular en *m/z* 1477, a las cual les falta el residuo primario de ácido 3-

hidroxidecanoico en la posición 3 o un residuo primario de ácido 3-hidroxitetradecanoico (bien en la posición 2 o 3'), respectivamente. Estos resultados indican una alta heterogeneidad entre las especies de lípido A en *B. pertussis* de tipo salvaje, lo cual no se resolvió aparentemente en el análisis de gel (Fig. 14). Resulta interesante que el cálculo de las cantidades relativas de las especies individuales de lípido A de sus valores máximos correspondientes reveló que en los LPS de *B. pertussis* de tipo salvaje, una gran cantidad de especies de lípido A (~50%) constan de formas tetra-aciladas. Además, la gran mayoría de especies de lípido A eran formas de monofosfato (~80%). Para excluir la posibilidad de que una alta abundancia de especies de lípidos A acilados e hipofosforilados fuera un resultado del proceso de hidrolización usado para aislar al lípido A, se evaluó si los periodos más cortos o largos de hidrolización (variando entre 1 y 4 h) influían en la abundancia relativa de las especies de lípido A, lo cual no fue, no obstante, el caso (datos no mostrados). Además, se determinó el contenido total de fosfato de una solución con una concentración conocida de LPS de *B. pertussis* de tipo salvaje purificados. De acuerdo con la prevalencia de especies de monofosfato de lípido A detectadas por ESI-MS, sólo se detectó poco más de la mitad del contenido de fosfato previsto una vez los LPS habían sido completamente fosforilados (datos no mostrados).

[0066] En cuanto a la expresión de la PagL_(Bb) (Fig. 15B), estuvieron presentes tres especies de lípido A en *m/z* 1081, 1307, y 1387, respectivamente.

El valor máximo en *m/z* 1307 corresponde con la forma desacetilada de monofosfato con la falta del residuo de ácido 3-hidroxidecanoico en la posición 3, mientras que el valor máximo en *m/z* 1387 corresponde con la forma bisfosforilada del ión molecular en *m/z* 1307. El valor máximo en *m/z* 1081 se corresponde con una forma de monofosfato con la falta tanto de residuos de ácido 3- hidroxidecanoico como de 3-hidroxitetradecanoico. El contenido relativo de especies de lípido A con la falta de residuo de ácido 3- hidroxidecanoico en la posición 3 aumentó de alrededor de un 37 por ciento en LPS de *B. pertussis* de tipo salvaje a un 92 en la cepa con la expresión de la PagL_(Bb). Así, aunque no se detectó movilidad electroforética de los LPS (Fig. 14, apartado 2), la paGL(Bb) codificada de 3-O-deacilasa de lípido A se encontraba activa en *B. pertussis*.

[0067] En cuanto a la expresión de PagP_(Ec) (Fig. 15C) y PagP_(Bp) (Fig. 15D), se detectaron nuevas especies de lípido A (tabla III). Los valores máximos en *m/z* 1320, 1490, 1545, 1625, 1715, y 1796 se corresponden con la palmitoilación prevista de PagP- mediado de los iones moleculares presentes en *m/z* 1081, 1251, 1307, 1387, 1477, y 1557, respectivamente. La diferencia en la eficiencia de la modificación entre *E. coli* y PagP de *B. pertussis*, lo cual se observó tras el análisis por Tricina-SDS- PAGE (Fig. 14), se reveló también en el análisis espectrométrico de masa. En la expresión de cepa de PagP de *E. coli*, se palmitoiló el ~47% de la población total de lípido A, en contraste con sólo el ~9% en la cepa con expresión PagP_(Bp). Resulta interesante que en la cepa con expresión PagP_(Bp), en contraste con la que expresa PagP_(Ec), no se encontraban especies de lípido A con la falta de un residuo de ácido 3-hidroxitetradecanoico al ser palmitoilada. Una posible explicación para esta discrepancia es la diferencia en la especificidad de las dos enzimas de PagP. Mientras que el PagP de *E. coli* aporta una cadena de acilo en la posición 2 de lípido A, el PagP de *B. pertussis* aporta un palmitato en la posición 3' (Bishop et al., EMBO J., 2000 ; Preston et al., Mol. Microbiol., 2003). Así, la ausencia completa de especies de lípido A palmitoilado con la pérdida de un residuo de ácido 3-hidroxitetradecanoico en la cepa con expresión de PagP de *B. pertussis* sugiere que las moléculas de lípido A con la falta de residuo de ácido 3-hidroxitetradecanoico se da específicamente en su posición 3'. Esto podría explicar entonces parcialmente la diferencia en la eficiencia de modificación que se observó entre las dos enzimas de PagP, cuando el conjunto de sustrato para PagP de *E. coli* sería mayor que aquel para PagP de *B. pertussis*. Además, esta hipótesis es coherente con la presencia de especies de lípido A hipoacilado *in vivo*.

Tabla III: Abundancia relativa de iones moleculares de lípido A determinada por ESI-MS

	1081	1251	1307	1320	1331	1387	1477	1490	1545	1557	1625	1715	1796	palmitoilado
	-C14-30H	-C14-30H	-C10-30H	-C14-30H	-C14-30H	-C10-30H	-PO4	-C14-30H	-C10-30H		-C10-30H	-PO4	+C16	
	-C10-30H	-PO4	-PO4	-C10-30H				-PO4	-PO4		+C16	+C16		
	-PO4			-PO4				+C16	+C16					
				+C16										
Tipo salvaje	3.0	15.6	29.9	0.0	4.5	3.9	29.0	0.0	0.0	14.1	0.0	0.0	0.0	0.0
PagL _(Bb)	8.5	2.1	70.9	0.0	0.0	12.8	3.5	0.0	0.0	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0
PagP _(Ec)	4.5	2.3	25.0	5.0	2.3	10.3	2.0	3.0	14.8	6.0	6.3	5.3	12.3	46.5
PagP _(Bp)	8.3	5.0	27.6	0.0	6.1	21.3	3.0	0.0	3.9	17.1	2.5	0.0	2.9	9.1

REFERENCIAS

[0068]

1. Raetz, C. R. H., y Whitfield, C. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* 71,635-700
- 5 2. Loppnow, H., Brade, H., Durrbaum, I., Dinarello, C. A., Kusumoto, S., Rietschel, E. T., y Flad, H. D. (1989) *J. Immunol.* 142,3229-3238
3. Steeghs, L., Berns, M., diez elevado, J., de Jong, A., Roholl, P., van Alphen, L., Tommassen, J., y van der Ley, P. (2002) *Cell. Microbiol.* 4,599-611
4. Nikaido, H., y Vaara, M. (1987) en *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., ed) Vol. 1, págs. 7-22, American Society for Microbiology, Washington, D. C .
- 10 5. Caroff, M., Karibian, D., Cavaillon, J-M., y Haeflner-Cavaillon, N. (2002) *Microbes Infect.* 4, 915-926
6. Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. P., Hackett, M., y Miller, S. I. (1997) *Science* 276, 250-253
7. Guo, L., Lim, K. B., Poduje, C. M., Daniel, M., Gunn, J. S., Hackett, M., y Miller, S. I. (1998) *Cell* 95, 189-198
8. Gunn, J. S., Belden, W. J., Miller, S. I. (1998) *Microb. Pathog.* 25,77-90
- 15 9. Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., y Miller, S. I. (1998) *Mol. Microbiol.* 27,1171- 1182
10. Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K., y Miller, S. I. (2000) *Infect.Immun.* 68,6139- 6146
11. Miller, S. I., Kukral, A. M., y Mekalanos, J. J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U..* 86,5054-5058
12. Gunn, J. S., y Miller, S. I. (1996) *J. Bacteriol.* 178,6857-6864
13. Ernst, R. K., Guina, T., y Miller, S. I. (1999) *J. Infect. Dis.* 179, Suppl. 2,326-330
- 20 14. Ernst, R. K., Yi, E. C., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M., y Miller, S. I. (1999) *Science* 286,1561- 1565
15. Trent, M. S., Ribeiro, A. A., Lin, S., Cotter, R. J., y Raetz, C. R. H. (2001) *J. Biol. Chem.* 276,43122-43131
16. Lee, H., Hsu, F. F., Turk, J., y Groisman, E. A. (2004) *J. Bacteriol.* 186,4124-4133 17.
17. Gibbons, H. S., Lin, S., Cotter, R. J., y Raetz C. R. H. (2000) *J. Biol. Chem.* 275,32940-32949
18. Karbarz, M. J., Kalb, S. R., Cotter, R. J., y Raetz, C. R. H. (2003) *J. Biol. Chem.* 278,39269-39279
- 25 19. Bishop, R. E., Gibbons, H. S., Guina, T., Trento, M. S., Miller, S. I., y Raetz, C. R. H. (2000) *EMBO J.* 19,5071- 5080
20. Tanamoto, K., y Azumi, S. (2000) *J. Immunol.* 164,3149-3156
21. Robey, M., O'Connell, W., y Cianciotto, N. P. (2001) *Infect. Immun.* 69,4276-4286
22. Trent, M. S., Pabich, W., Raetz, C. R. H., y Miller, S. I. (2001) *J. Biol. Chem.* 276,9083-9092
23. Bhat, U. R., Forsberg, L. S., y Carlson, R. W. (1994) *J. Biol. Chem.* 269,14402-14410
- 30 24. Moran, A. P., Lindner, B., y Walsh, E. J. (1997) *J. Bacteriol.* 179,6453-6463
25. Kumada, H., Haishima, Y., Umemoto, T., y Tanamoto, K. (1995) *J. Bacteriol.* 177,2098-2106
26. Tommassen, J., van Tol, H., y Lugtenberg, B. (1983) *EMBO J.* 2,1275-1279
27. Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour (NY)
- 35 28. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227,680-685
29. Dekker, N., Merck, K., Tommassen, J., y Verheij, H. M. (1995) *Eur. J. Biochem.* 232,214-219
30. Lesse, A. J., Campagnari, A. A., Bittner, W. E., y Apicella, M. A. (1990) *J. Immunol. Métodos* 126,109-117
31. Tsai, C. M., y Frasch, C. E. (1982) *Anal. Biochem.* 119,115-119
32. Westphal, O., y Jann, J.K. (1965) *Methods Carbohydr. Chem.* 5,83-91
- 40 33. Wilm, M., y Mann, M. (1996) *Anal. Chem.* 68,1-8
34. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* 215,403-410
35. Nielsen, H., Brunak, S., y von Heijne, G. (1999) *Protein Eng.* 12,3-9
36. Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. e., Holden, M. T., Churcher, C. M., Bentley, S. D., Mungall, K. L., Cerdono-Tarraga, A. M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M. A., Achtman, M.,
- 45 37. Atkins, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B. G., y Maskell, D. J. (2003) *Nat. Genet.* 35,32-40
- 50 37. Snijder, H. J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K. H., Verheij, H. M., Egmond, M. R., Dekker, N., y Dijkstra, B. W. (1999) *Nature* 401,717-721
38. McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Igo, D., Leonardo, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., sol, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., y Wilson, R. K. (2001) *Nature* 413,852-856
- 55 39. Basu, S. S., White, K. A., Que, N. L., y Raetz, C. R. H. (1999) *J. Biol. Chem.* 274,11150-11158
40. Kulshin, V. A., Zahring, U., Lindner, B., Jager, K. E., Dmitriev, B. un., y Rietschel, E. T. (1991) *Eur. J. Biochem.* 198,697-704
41. Hwang, P. M., Choy, W. Y., Lo, E. I., Chen, L., Forman-Kay, J. D., Raetz, C. R., Prive, G. G., Bishop, R. E., y Kay, L. E. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU.* 99,13560-13565
- 60 42. Kol, M. A., van Dalen, A., de Kroon, A. I., y de Kruijff, B. (2003) *J. Biol. Chem.* 278,24586-24593
43. von Heijne, G. (1983) *Eur. J. Biochem.* 133,17-21

ES 2 493 440 T3

44. Tommassen, J. (1988) en Membrane Biogenesis (Op den Kamp, J.A.F., ed) en la serie en NATO ASI series, Vol. H16, Págs. 351- 373. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York .
45. Haas, D., y Holloway, B.W. (1976) Mol. Gen. Genet. 144,243-251
46. Pace, J., Hayman, M. J., y Galan, J. E. (1993) Cell 72,505-514
- 5 47. Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166,557-580
48. Thalen, M., van den IJssel, J., Jiskoot, W., Zomer, B., Roholl, P., de Gooijer, C., Beuvery, C., y Trampen, J. (1999) J.Biotechnol. 75,147-159.
49. Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., y Riethmuller, G. (1988) J. Cancer 41,456-461
50. Simon, R., Priefer, U., y Puhler, A. A. (1983) Bio/Technol. 1,784-791
- 10 51. Furste, J. P., Pansegrau, W., rank, R., Blocker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., y Lanka, E. (1986) gen 48,119-131
52. Stibitz, S., Black, W., y Falkow, S. (1986) Gene 50,133-140

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 [0069]
- <110> Nederlands Vaccin Instituut
- <120> Desacilación de LPS en bacterias Gram negativas
- 20 <130> P218195 EP
- <160> 17
- 25 <170> Versión PatentIn 3.3

ES 2 493 440 T3

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

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

Ser Leu His Tyr Gly Ile Gly Asp His Tyr Gln Arg Val Thr Leu Asn
35 40 45

Tyr Glu Thr Pro Thr Leu Trp Ser His Gln Phe Gly Gly Asn Trp Gly
50 55 60

Arg Leu Asp Leu Thr Pro Glu Leu Gly Ala Ser Tyr Trp Trp Ala Asp
65 70 75 80

Gly Ser Arg Ser Pro Gly His Val Trp Gln Ala Ser Ala Ile Pro Met
85 90 95

Phe Arg Trp Trp Thr Gly Glu Arg Phe Tyr Ile Glu Ala Gly Ile Gly
100 105 110

Ala Thr Val Phe Ser Ser Thr Ser Phe Ala Asp Lys Arg Ile Gly Ser
115 120 125

Ala Phe Gln Phe Gly Asp His Ile Gly Leu Gly Phe Leu Leu Thr Pro
130 135 140

Ser Asn Arg Ile Gly Leu Arg Tyr Ser His Phe Ser Asn Ala Gly Ile
145 150 155 160

Lys Glu Pro Asn Pro Gly Leu Asp Ile Val Gln Leu Thr Tyr Thr Tyr
165 170 175

Gln Phe

<210> 1

<211> 178

5 <212> PRT

<213> Bordetella sp.

<400> 1

<210> 2

10 <211> 537

<212> ADN

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 2

ES 2 493 440 T3

atgcaatttc tcaagaaaaa caagcccctg ttcggcatcg ttacactggc tctggcatgt
60

gccaccgcc aggcgagcc cactcagggc ggggtcagcc tgcattacgg tattggcgac
120

cactatcagc gcgtcacgct gaactacgaa acccccacgc tctggagcca ccagttcggc
180

ggcaattggg gccgcctgga cctgaccccc gaactgggcg cgtcatactg gtgggccgac
240

ggctcgcgct cgcccgcca cgtgtggcag gccagcgcca ttccgatgtt ccgctggtgg
300

accggcgagc gcttttacat cgaggcggc atcgcgcca cggttttcag cagcaccagc
360

ttcgccgaca agcgcatcgg ttcggccttc cagtttggcg accatatcgg gctgggcttc
420

ctgctgacgc ccagcaaccg catcggcctg cgctattcgc acttctccaa cgccggcatc
480

aaggaaccga accccggcct cgatatcgtg cagctgacct atacgtacca gttctga
537

<210> 3

<211> 537

5 <212> ADN

<213> Bordetella parapertussis

<400> 3

10

atgcaatttc tcaagaaaaa caagcccctg ttcggcatcg ttacactggc tctggcatgt
60

gccaccgcc aggcgagcc cactcagggc ggggtcagcc tgcactacgg tattggcgac
120

cactatcagc gcgtcacgct gaactacgaa acccccacgc tctggagcca ccagttcggc
180

ggcaattggg gccgcctgga cctgaccccc gaactgggcg cgtcgtactg gtgggccgac
240

ES 2 493 440 T3

ggctcgcgct cgcccggcca cgtgtggcag gccagcgcca ttccgatgtt ccgctggtgg
300

accggcgagc gcttctacat cgaggccggc atcggcgcca cggttttcag cagcaccage
360

ttcgccgaca agcgcatcgg ttcggccttc cagtttggcg accatatcgg gctgggcttc
420

ctgctgacgc ccagcaaccg catcggcctg cgctattcgc acttctccaa cgcgggcate
480

aaggaaccga accccggcct cgatatcgtg cagctgacct atacgtacca gttctga
537

<210> 4

<211> 535

<212> ADN

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 4

atgcaatttc tcaagaaaaa caagcccctg ttcggcacgc ttacactggc cctggcatgt
60

gccaccgccc aggcgcagcc cactcagggc ggggtgcctg cattacggta ttggcgacca
120

ctatcagcgc gtcacgctga actacgaaac tcccacgctc tggagccacc agttcggcgg
180

aaattggggc cgctggacc tgacccccga actgggcgcg tcgtactggt gggccgacgg
240

ctcgcgctcg cccggccacg tgtggcaggc cagcgccatt ccgatgttcc gctggtggac
300

cggcgagcgc ttctacatcg aggcgggcac cggcgccacg gttttcagca gcaccagctt
360

cgccgacaag cgcacggtt cggccttcca gtttggcgac catatcggac tgggcttcc
420

gctgacgccc agcaatcgta tcggcctgcg ctattcgcat ttctcgaacg ccggcatcaa
480

ggaaccgaac cccggcctgg atatcgtgca gctgacctat acgtaccagt tctga
535

10

<210> 5

<211> 537

<212> ADN

<213> Bordetella pertussis

15

<220>

ES 2 493 440 T3

<221> Desplazamiento del marco de lectura restaurado.

<222> (96)..(97)

5 <400> 5

atgcaatttc tcaagaaaaa caagcccctg ttcggcacgc ttacactggc cctggcatgt
60

gccaccgccc aggcgcagcc cactcagggc ggggtcagcc tgcattacgg tattggcgac
120

cactatcagc gcgtcacgct gaactacgaa actcccacgc tctggagcca ccagttcggc
180

ggaaattggg gccgcctgga cctgaccccc gaactggggc cgtcgtactg gtgggcccac
240

ggctcgcgct cgcccggcca cgtgtggcag gccagcgcca ttccgatgtt ccgctggtgg
300

accggcgagc gcttctacat cgaggccggc atcggcgcca cggttttcag cagcaccagc
360

ttcgccgaca agcgcacgcg ttccggcctc cagtttggcg accatatcgg actgggcttc
420

ctgctgacgc ccagcaatcg tatcggcctg cgctattcgc atttctcgaa cgccggcatc
480

aaggaaccga accccggcct ggatatcgtg cagctgacct atacgtacca gttctga
537

10 <210> 6
<211> 173
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

15 <400> 6

ES 2 493 440 T3

Met Lys Lys Leu Leu Pro Leu Ala Val Leu Ala Ala Leu Ser Ser Val
1 5 10 15

His Val Ala Ser Ala Gln Ala Ala Asp Val Ser Ala Ala Val Gly Ala
20 25 30

Thr Gly Gln Ser Gly Met Thr Tyr Arg Leu Gly Leu Ser Trp Asp Trp
35 40 45

Asp Lys Ser Trp Trp Gln Thr Ser Thr Gly Arg Leu Thr Gly Tyr Trp
50 55 60

Asp Ala Gly Tyr Thr Tyr Trp Glu Gly Gly Asp Glu Gly Ala Gly Lys
65 70 75 80

His Ser Leu Ser Phe Ala Pro Val Phe Val Tyr Glu Phe Ala Gly Asp
85 90 95

Ser Ile Lys Pro Phe Ile Glu Ala Gly Ile Gly Val Ala Ala Phe Ser

100

105

110

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

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

Val Arg Ala Ile His Tyr Ser Asn Ala Gly Leu Lys Gln Pro Asn Asp
145 150 155 160

Gly Ile Glu Ser Tyr Ser Leu Phe Tyr Lys Ile Pro Ile
165 170

<210> 7

<211> 172

<212> PRT

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 7

ES 2 493 440 T3

Val Lys Arg Leu Phe Cys Leu Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Met Gly
1 5 10 15

Gln Ser Phe Thr Ala Gln Ala Ala Gly Val Glu Phe Ala Val Gly Ala
20 25 30

Thr Ser Asp Ser Thr Met Thr Tyr Arg Leu Gly Met Asn Phe Asp Trp
35 40 45

Asp Lys Ser Trp Leu Gln Ser Asp Val Gly Arg Leu Thr Gly Tyr Trp
50 55 60

Ser Gly Ala Tyr Thr Tyr Trp Glu Gly Asp Lys Thr Ser Ser Asn Asn
65 70 75 80

Ser Leu Ser Phe Ser Pro Val Phe Val Tyr Glu Phe Ala Gly Gln Ser
85 90 95

Val Lys Pro Tyr Val Glu Ala Gly Ile Gly Val Ala Leu Phe Ser Asn
100 105 110

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

Arg Leu Gly Phe Gly Leu Arg Phe Asn Gly Gly His Glu Val Gly Ile
130 135 140

<210> 8

<211> 172

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas syringae

<400> 8

ES 2 493 440 T3

Met Lys Arg Leu Phe Cys Leu Ala Val Ile Ala Ala Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ala Asp Gly Val Glu Phe Ser Val Gly Gln
20 25 30

Thr Gly Glu Ser Thr Met Thr Tyr Arg Leu Gly Val Gln Phe Asp Trp
35 40 45

Asp Lys Thr Trp Leu Gln Ser Asp Ile Gly Arg Leu Thr Gly Tyr Trp
50 55 60

Asp Gly Ala Tyr Thr Tyr Trp Asp Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asn His
65 70 75 80

Ser Leu Ser Phe Ser Pro Val Leu Val Tyr Glu Phe Gly Asn Gly Asn
85 90 95

Val Lys Pro Tyr Leu Glu Ala Gly Ile Gly Val Ser Val Phe Ser Asn
100 105 110

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

Arg Ile Gly Phe Gly Leu Arg Phe Ala Gly Gly His Glu Val Gly Ile
130 135 140

Arg Ala Thr His Tyr Ser Asn Ala Gly Ile Lys Glu Pro Asn Asp Gly
145 150 155 160

Ile Glu Ser Tyr Ala Leu His Tyr Lys Met Pro Phe
165 170

<210> 9

<211> 173

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 9

ES 2 493 440 T3

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

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

Ala Thr Gly Gln Gly Asp Met Thr Tyr Arg Ile Gly Met Ser Phe Asp
35 40 45

Trp Asp Lys Lys Trp Leu Glu Ser Ser Thr Gly His Val Ser Gly Tyr
50 55 60

Trp Asp Ala Ala Tyr Thr Tyr Trp Glu Gly Gly Asp Ala Ser Gly Ala
65 70 75 80

His Ser Leu Ser Phe Ser Pro Val Phe Thr Tyr Glu Phe Ser Gly Phe
85 90 95

Thr Tyr Thr Pro Tyr Ile Glu Ala Gly Ile Gly Leu Ala Ala Phe Ser
100 105 110

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

Asp Arg Ile Gly Phe Gly Leu Lys Leu Pro Gly Glu Gln Lys Val Gly
130 135 140

Ile Arg Ala Met His Tyr Ser Asn Ala Gly Ile Lys Gln Pro Asn Asp
145 150 155 160

Gly Ile Glu Ser Tyr Ser Leu Phe Tyr Ser Thr Ala Phe
165 170

<210> 10

<211> 172

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 10

Met Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Gly
1 5 10 15

ES 2 493 440 T3

Gln Ala Met Ser Ala Gln Ala Ala Asp Val Ser Phe Ser Val Gly Gln
20 25 30

Thr Gly Asp Ser Thr Met Val Tyr Arg Leu Gly Leu Gln Ser Asn Trp
35 40 45

Asp Ala Ser Trp Trp Gln Thr Ser Val Gly Arg Leu Thr Gly Tyr Trp
50 55 60

Asp Gly Ala Tyr Thr Tyr Trp Asp Gly Asp Glu Thr Ala Ser Asn His
65 70 75 80

Ser Leu Ser Phe Ala Pro Val Phe Val Tyr Glu Phe Ala Gly Glu Ser
85 90 95

Val Lys Pro Tyr Ile Glu Ala Gly Ile Gly Val Ala Ala Phe Ser Ser
100 105 110

Thr Glu Leu Glu Ser Asn Glu Leu Gly Ser Ala Phe Gln Phe Glu Asp
115 120 125

Arg Ile Gly Phe Gly Leu Arg Phe Ala Gly Gly His Glu Ile Gly Val
130 135 140

Arg Ala Ile His Tyr Ser Asn Ala Gly Ile Lys Glu Pro Asn Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Ser Tyr Ser Leu His Tyr Arg Met Ala Leu
165 170

<210> 11

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Burkholderia fungorum

<400> 11

ES 2 493 440 T3

Met Asn Asn Lys Lys Asn Val Leu Arg Asp Leu Ala Leu Lys Ile Thr
1 5 10 15

Ala Gly Ala Val Leu Val Gly Ala Ser Gly Val Ala Ser Ala Asp Gln
20 25 30

Phe Gly Val Gln Val Ala Gly Gly Leu Gly Asp Arg His Val Lys Lys
35 40 45

Leu Asp Leu Gly Phe Val Trp Asp Pro Asp Leu Asn Trp Trp Gln Ile
50 55 60

Gly Asp Trp His Phe Ser Leu Ile Gly Glu Ala His Val Ala Trp Trp
65 70 75 80

His Thr Asn Glu Gly Asn Val His Asp Asn Ile Gly Glu Val Gly Val
85 90 95

Thr Pro Ile Ile Arg Phe Ile Lys Glu Ser Gly Pro Ile Arg Pro Tyr
100 105 110

Ala Glu Leu Gly Ala Gly Ile Arg Leu Leu Ser Ser Pro Arg Ile Ser
115 120 125

Ser Thr Phe Thr Leu Gly Thr Ala Phe Gln Phe Ala Asp Met Ala Gly
130 135 140

Val Gly Met Gln Phe Gly Asn Arg Gln Gln Tyr Gln Ala Gly Tyr Arg
145 150 155 160

Phe Gln His Ile Ser Asn Gly Gly Ile Lys Glu Pro Asn Pro Gly Ile
165 170 175

Asn Phe His Gln Leu Tyr Leu Gln Tyr Asn Phe
180 185

<210> 12

<211> 189

<212> PRT

5 <213> Burkholderia mallei

<400> 12

ES 2 493 440 T3

Met Asn Asp Lys Asn Gly Gly Arg Val Gly Arg Ala Ile Ala Arg Thr
1 5 10 15

Ala Leu Ala Leu Ala Leu Val Gly Ala Ser Gly Ser Ala Phe Ala Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Leu Gln Leu Gly Gly Gly Val Ala Asp His Asp Met Lys
35 40 45

Lys Gly Asp Ile Ala Val Val Trp Asp Pro Asn Trp Thr Trp Trp Glu
50 55 60

Ile Gly Gly Trp His Phe Ala Phe Val Ala Glu Gly His Leu Ser Tyr
65 70 75 80

Trp Arg Tyr Thr Gly Asp Arg Ala Ile Asn Ser Ser Ile Trp Glu Val
85 90 95

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

Pro Phe Val Glu Leu Gly Ala Gly Val Arg Phe Leu Ser His Pro Thr
115 120 125

Ile Ser Gln Asn Tyr Ser Met Ser Thr Ser Phe Gln Phe Ala Asp Met
130 135 140

Val Gly Val Gly Ala Gln Phe Gly Asn His Gln Gln Tyr Gln Ala Gly
145 150 155 160

Phe Arg Phe Gln His Val Ser Asn Ala Gly Ile Lys Asp Pro Asn Pro
165 170 175

Gly Ile Asn Phe Ser Gln Leu Tyr Val Gln Tyr Asn Phe
180 185

<210> 13

<211> 189

<212> PRT

5 <213> Burkholderia pseudomallei

ES 2 493 440 T3

Met Asn Asp Lys Asn Gly Gly Arg Val Gly Arg Ala Ile Ala Arg Thr
1 5 10 15

Ala Leu Ala Leu Ala Leu Val Gly Ala Ser Gly Ser Ala Phe Ala Asp
20 25 30

Arg Trp Gly Leu Gln Leu Gly Gly Gly Val Ala Asp His Asp Met Lys
35 40 45

Lys Gly Asp Ile Ala Val Val Trp Asp Pro Asn Trp Thr Trp Trp Glu
50 55 60

Ile Gly Gly Trp His Phe Ala Phe Val Ala Glu Gly His Leu Ser Tyr
65 70 75 80

Trp Arg Tyr Thr Gly Asp Arg Ala Ile Asn Ser Ser Ile Trp Glu Val
85 90 95

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

Pro Phe Val Glu Leu Gly Ala Gly Val Arg Phe Leu Ser His Pro Thr
115 120 125

Ile Ser Gln Asn Tyr Ser Met Ser Thr Ser Phe Gln Phe Ala Asp Met
130 135 140

Val Gly Val Gly Ala Gln Phe Gly Asn Arg Gln Gln Tyr Gln Ala Gly
145 150 155 160

Phe Arg Phe Gln His Val Ser Asn Ala Gly Ile Lys Asp Pro Asn Pro
165 170 175

Gly Ile Asn Phe Ser Gln Leu Tyr Val Gln Tyr Asn Phe
180 185

<400> 13

<210> 14

<211> 177

<212> PRT

5 <213> Azotobacter vinelandii

ES 2 493 440 T3

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

Ser Ala Gly Val Ala Gln Ala Val Glu Val Gly Ala Ala Val Gly Val
20 25 30

Thr Ser Gln Asn Asp Met Thr Tyr Arg Leu Ser Leu Gly Leu Pro Trp
35 40 45

Glu Lys Gln Trp Trp Lys Ser Asp Leu Gly Tyr Val Thr Gly Tyr Trp
50 55 60

Asp Ala Gly Tyr Thr Tyr Trp Glu Gly Gly Ser Gly Asn Asp Asn Tyr
65 70 75 80

Ala Gly Ala His Ser Leu Ser Phe Ser Pro Val Phe Thr Tyr Glu Phe
85 90 95

Ser Gly Phe Ser Ser Val Thr Pro Phe Leu Glu Leu Gly Val Gly Val
100 105 110

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

Phe Asn Phe Glu Asp Arg Ile Gly Ala Gly Ile Lys Phe Ala Gly Gly
130 135 140

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

Gln Pro Asn Asp Gly Ile Glu Ser Phe Ser Ala Tyr Tyr Ser His Ala
165 170 175

Phe

<400> 14

<210> 15

<211> 195

<212> PRT

5 <213> Ralstonia metallidurans

<400> 15

ES 2 493 440 T3

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

Ala Ile Ala Ala Leu Val Ala Gly Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ala Glu
20 25 30

Glu Leu Val Gly Trp Ala His Pro Ala Val Gln Ala Ala Phe Ala Arg
35 40 45

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

Thr Pro Ile Gln Tyr Gly Asn Pro Asp Gly Trp Leu Phe Arg Leu Gln
65 70 75 80

Ala Glu Ala Asn Met Gly Tyr Trp Asp Ala Arg Ser Gly Thr Asn Arg
85 90 95

Gln Asn Leu Met Glu Phe Gly Leu Thr Pro Ile Leu Arg Val Glu Lys
100 105 110

Arg Gly Gly Tyr Phe Val Pro Phe Leu Glu Ala Gly Val Gly Leu Arg
115 120 125

Leu Leu Thr His Thr Ser Thr Ser Asp Gln His Asn Phe Ser Thr Ala
130 135 140

Phe Gln Phe Gly Asp Met Val Gly Leu Gly Val Gly Phe Gly Lys Asn
145 150 155 160

Ala Ala Thr Glu Val Gly Met Arg Phe Gln His Ile Ser Asn Ala Gly
165 170 175

Ile Lys Glu Pro Asn Pro Gly Thr Asn Leu Tyr Thr Gly Tyr Val Arg
180 185 190

Tyr Arg Phe
195

<210> 16

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Ralstonia solanacearum

<400> 16

ES 2 493 440 T3

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

Val Ser Ala Ala Thr Leu Leu Ala Ala Ala Pro Ala Gln Ala Asp Pro
20 25 30

Ser Val Arg Ala Ile Tyr Gly Arg Asp Asn Arg His Gly Ile Glu Lys
35 40 45

Tyr Gly Val Asp Ile Asp Phe Asp Ser Gly Phe His Cys Gly Asn Pro
50 55 60

Gln Gly Trp Phe Leu Asn Leu Asp Trp Glu Ile Ala Leu Gly Gln Trp
65 70 75 80

Arg Ser Thr Lys Gly Thr Asn Arg Gln Asn Leu Thr Glu Phe Gly Val
85 90 95

Thr Pro Leu Phe Arg Leu Glu Lys Arg Gly Gly Ser Trp Val Pro Phe
100 105 110

Ile Glu Ala Gly Ile Gly Pro Arg Leu Leu Ser His Thr Arg Thr Ser
115 120 125

Asp Glu His Asn Phe Ser Thr Ala Phe Gln Phe Ser Asp Met Ile Gly
130 135 140

Val Gly Val Ala Phe Gly Ser Arg Gln Gln Phe Gln Val Gly Tyr Arg
145 150 155 160

Phe Glu His Leu Ser Asn Ala Ser Ile Lys Arg Pro Asn Pro Gly Thr
165 170 175

Asp Leu Asn Glu Leu Tyr Leu Arg Tyr Thr Phe
180 185

- 5 <210> 17
- <211> 187
- <212> PRT
- <213> Salmonella typhimurium

- 10 <400> 17

ES 2 493 440 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Bacteria de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* o *Bordetella bronchiseptica* o bacteria de la especie de *Neisseria* que comprende un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificando un polipéptido con al menos 95% identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID n°: 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos confiere un aumento en la actividad de la 3-O-deacilasa del lípido A en comparación con la bacteria de tipo salvaje.
- 10 2. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 1, donde la bacteria es *Neisseria Meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria lactamica*.
- 15 3. Bacteria de *Bordetella pertussis* que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n° 1 y que confiere actividad de 3-O-deacilasa de lípido A a la bacteria.
- 20 4. Método para la producción de LPS al menos parcialmente 3-O-desacetilados, donde el método comprende el proceso de cultivo de una bacteria tal y como se describe en las reivindicaciones de 1 a 3 bajo condiciones propicias para la síntesis de LPS al menos parcialmente 3-O-desacetilados y, opcionalmente, recuperación de LPS al menos parcialmente 3-O-desacetilados, donde los LPS al menos parcialmente 3-O-desacetilados comprenden al menos el 10 por ciento de su total de lípido A en la forma 3-O-desacetilada.
- 25 5. Composición que comprende LPS obtenibles a partir de una bacteria *Bordetella pertussis* o bacterias de *Neisseria* tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, donde al menos el 10 por ciento del total de lípido A en los LPS en la composición se encuentra en la forma 3-O-desacetilada.
- 30 6. Bacterias de *Bordetella pertussis* de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 3, para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones de *Bordetella pertussis*.
- 35 7. Uso de bacterias de *Bordetella pertussis* de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 3 para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección de *Bordetella pertussis*.
- 40 8. Composición que consta de LPS obtenibles a partir de bacterias de *Bordetella pertussis* tal y como se describe en las reivindicaciones de 1 a 3, donde al menos el 10 por ciento de lípido A total en los LPS en la composición se encuentra en forma 3-O-desacetilada, para su uso en el tratamiento o prevención de infección de *Bordetella pertussis*.
- 45 9. Uso de una composición que comprende LPS obtenibles a partir de una bacteria de *Bordetella pertussis* tal y como se describe en las reivindicaciones de 1 a 3, donde al menos el 10 por ciento del total de lípido A en los LPS en la composición se encuentra en la forma 3-O-desacetilada, para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección de *Bordetella pertussis*.
- 50 10. Vacuna de células enteras que comprende una bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, donde la bacteria es *Bordetella pertussis* o del género *Neisseria*.
11. Vacuna acelular que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 5.
12. Método in vitro para la desacilación de LPS de bacterias de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* o *Bordetella bronchiseptica* o especies de *Neisseria* o composiciones que comprenden LPS, comprendiendo el proceso de la puesta en contacto de LPS o la composición con un polipéptido que muestra al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID n°: 1 y que muestra actividad de 3-O-deacilasa de lípido A, bajo condiciones propicias para la desacilación enzimática de LPS de bacterias Gram negativas.

Fig 1a

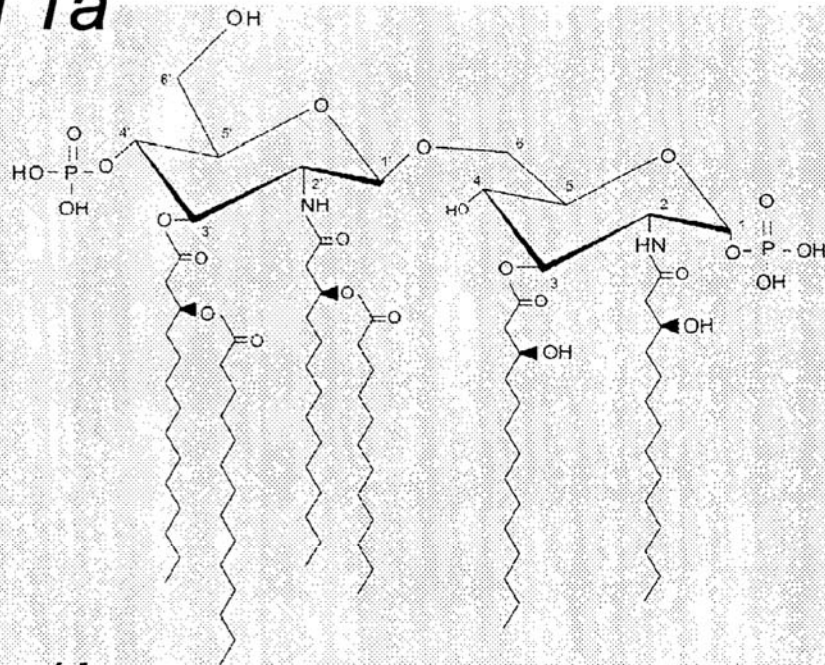


Fig 1b

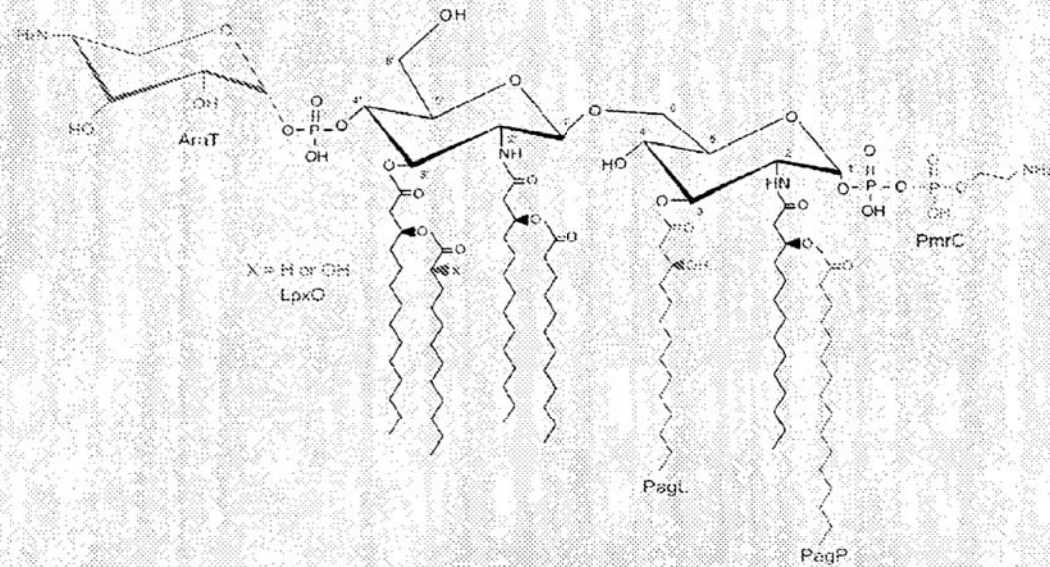


Fig 2

<i>S. typhimurium</i>	1	-----MYMKRIFITLLLEPCAFACSANONVFFGK-----GNKHQISFA	37
<i>B. bronchiseptica</i>	1	-----MQFLKKKKPLPGIVTLALACATAQAQ-----PTQGGVSLH	35
<i>B. parapertussis</i>	1	-----MQFLKKKKPLPGIVTLALACATAQAQ-----PTQGGVSLH	35
<i>B. pertussis</i>	1	-----MQFLKKKKPLPGIVTLALACATAQAQ-----PTQGGVSLH	35
<i>P. aeruginosa</i>	1	-----MK-KLFLAVIAAALSSVHVASAOAA-----DVSAVVG-A	32
<i>P. fluorescens</i>	1	-----MK-RLTCLAAIAAALMCQSTTAQAA-----GVEFAVG-A	32
<i>P. putida</i>	1	-----MKTRLAASLAVAVLAFAGADLVQAA-----QISGAVG-A	33
<i>P. syringae</i>	1	-----MK-RLTCLAVIAAALAGQASTAQAD-----GVEPSVG-C	32
<i>B. fungorum</i>	1	-----MNNKKNVLRDLAKITAGAV-LVGSAGVASAD-----QFGVOVAGC-L	41
<i>B. mallei</i>	1	-----MNDKNGGVRGAIARTALALALVGASGSAFAD-----RWGLQLGGG-V	42
<i>B. pseudomallei</i>	1	-----MNDKNGGVRGAIARTALALALVGASGSAFAD-----RWGLQLGGG-V	42
<i>R. metallidurans</i>	1	-----MPPANLSRKLPSPRLATAALVAGASSAASAEELNCAWHPAVQAFAFD	49
<i>R. solanacearum</i>	1	-----NTRSALEPR---SAKILAAVSAATLLAAFAAQ-----ADPSVRAITYGRD	41
<i>A. vinelandii</i>	1	-----MR-KYISLSAVAVLLGSSAGVAQAV-----EVGRAVG-V	32
<i>S. typhimurium</i>	38	AGESTIRGGVHLYTAFLTYSEPSS---FELQARNNLELGGFKAK-GSDDCSKHISGV	92
<i>B. bronchiseptica</i>	36	YGIGDHYQRTVINYETPTLNSHQPGGNGWRDLTPELGASYWADGS-RSPGHVQASAI	94
<i>B. parapertussis</i>	36	YGIGDHYQRTVINYETPTLNSHQPGGNGWRDLTPELGASYWADGS-RSPGHVQASAI	94
<i>B. pertussis</i>	36	YGIGDHYQRTVINYETPTLNSHQPGGNGWRDLTPELGASYWADGS-RSPGHVQASAI	94
<i>P. aeruginosa</i>	33	TSQSGMTYRLGLSWDMKKNQIIT---GRISGYWDAGTYWEGG---DEGAGKHSLSFA	86
<i>P. fluorescens</i>	33	TSQSGMTYRLGLSWDMKKNQIIT---GRITGYWAGAYTYWEGG---XTSSNNGLSFS	85
<i>P. putida</i>	34	TGQGDMTYRLGMSIDWEKKWLESST---GHVSCYWDAAATYWEGG---DASGHSLSFS	86
<i>P. syringae</i>	33	TGQSGMTYRLGLSWDMKKNQIIT---GRITGYWAGAYTYWEGG---XTSSNNGLSFS	85
<i>B. fungorum</i>	42	GDRHVKKLDLGFVWDPCLNWWQICD---WHESLIGEAHVAVH-HTNEGNVHNDIGEVGT	97
<i>B. mallei</i>	43	ADHDMKKCDTAVVWDPNWTFWETCG---WHFAFVAEGHLSYWRYTGDRAINSSWEVGAT	99
<i>B. pseudomallei</i>	43	ADHDMKKCDTAVVWDPNWTFWETCG---WHFAFVAEGHLSYWRYTGDRAINSSWEVGAT	99
<i>R. metallidurans</i>	50	TONGINKYETAVNYETPIQYGNPDC---WLEFLQAEANNGYW-DARSGTNKRONLMEFGLT	105
<i>R. solanacearum</i>	42	NRHGIEKYGVLDSDSGHICGNPDC---WLEFLQAEANNGYW-DARSGTNKRONLMEFGLT	97
<i>A. vinelandii</i>	33	TSQNDMTYRLGLSWDMKKNQIIT---GRITGYWAGAYTYWEGG---XTSSNNGLSFS	86
<i>S. typhimurium</i>	93	PCNKYNQGVLTGSKOVALVHEAGIYNTGIGLGAYIKSKSRDMPVNSAETFGKAEFLWNEF	152
<i>B. bronchiseptica</i>	95	PMFRWWTG-----ERFY---EAGIGATVFSSTSFADKR-IGSAFQFGDHIGLGLL	142
<i>B. parapertussis</i>	95	PMFRWWTG-----ERFY---EAGIGATVFSSTSFADKR-IGSAFQFGDHIGLGLL	142
<i>B. pertussis</i>	95	PMFRWWTG-----ERFY---EAGIGATVFSSTSFADKR-IGSAFQFGDHIGLGLL	142
<i>P. aeruginosa</i>	87	PVEVYEFAG-DS-----IKPF---EAGIGVAAFSCTRVGDN-LGSLNFEEDRIGAGLKF	137
<i>P. fluorescens</i>	86	PVEVYEFAG-QS-----VKPY---EAGIGVAAFSCTRVGDN-LGSLNFEEDRIGAGLKF	136
<i>P. putida</i>	87	PVEVYEFAG-PT-----XTPY---EAGIGVAAFSCTRVGDN-LGSLNFEEDRIGAGLKF	137
<i>P. syringae</i>	86	PVEVYEFAG-GN-----VKPY---EAGIGVAAFSCTRVGDN-LGSLNFEEDRIGAGLKF	136
<i>B. fungorum</i>	98	PIIRFIKES-GF-----IRPY---AELGAGIRLLSSPRISSFTTLGIAFQADMAVGVMQF	149
<i>B. mallei</i>	100	PIIRFIKES-GY-----VRPF---YELGAGVRLSHPTISQNYSMSTSFQADMAVGVMQF	151
<i>B. pseudomallei</i>	100	PIIRFIKES-GY-----VRPF---YELGAGVRLSHPTISQNYSMSTSFQADMAVGVMQF	151
<i>R. metallidurans</i>	106	PILREKRG-GY-----FVPE---LEAGVGLRLTHTSTSDQHNFSTAFQCDMVLGVGF	157
<i>R. solanacearum</i>	98	PILREKRG-GS-----WVPE---LEAGVGLRLTHTSTSDQHNFSTAFQCDMVLGVGF	149
<i>A. vinelandii</i>	90	PVEVYEFAG-FS-----VTPF---LEAGVGLRLTHTSTSDQHNFSTAFQCDMVLGVGF	141
<i>S. typhimurium</i>	153	GAFS---TEAYIRHFSKGLTDKESGHNFEVGASISYNE	187
<i>B. bronchiseptica</i>	143	TPSN---RIGLRYSHFSNAGIKEPNFGLDIVQLTYTYQF	178
<i>B. parapertussis</i>	143	TPSN---RIGLRYSHFSNAGIKEPNFGLDIVQLTYTYQF	178
<i>B. pertussis</i>	143	TPSN---RIGLRYSHFSNAGIKEPNFGLDIVQLTYTYQF	178
<i>P. aeruginosa</i>	138	ANGQ---SVGVRAIHYSNAGIKQPNNGIESYSLYFYKPI	173
<i>P. fluorescens</i>	137	NGGH---EVSIRATHYSNAGLSSNDGVESYSLYHTMPL	172
<i>P. putida</i>	138	PGEQ---RVGIRAMHYSNAGIKQPNNGIESYSLYFYKPI	173
<i>P. syringae</i>	137	AGGH---EVSIRATHYSNAGIKEPNNGIESYSLYFYKPI	172
<i>B. fungorum</i>	150	GNRQOYQAGYRFORISNGGIEKERNPGNEHOLYLYQNE	187
<i>B. mallei</i>	152	GNRQOYQAGYRFORISNAGIKDPNPGNFGSOLYVQYNE	189
<i>B. pseudomallei</i>	152	GNRQOYQAGYRFORISNAGIKDPNPGNFGSOLYVQYNE	189
<i>R. metallidurans</i>	158	GKNAATEVGMRFORISNAGIKEPNFGNLYTGYYRYF	195
<i>R. solanacearum</i>	150	GSRQOYQAGYRFORISNAGIKDPNPGNFGSOLYVQYNE	187
<i>A. vinelandii</i>	142	AGCQ---RVGIRATHYSNAGIKQPNNGIESYSLYFYKPI	177

Fig 3

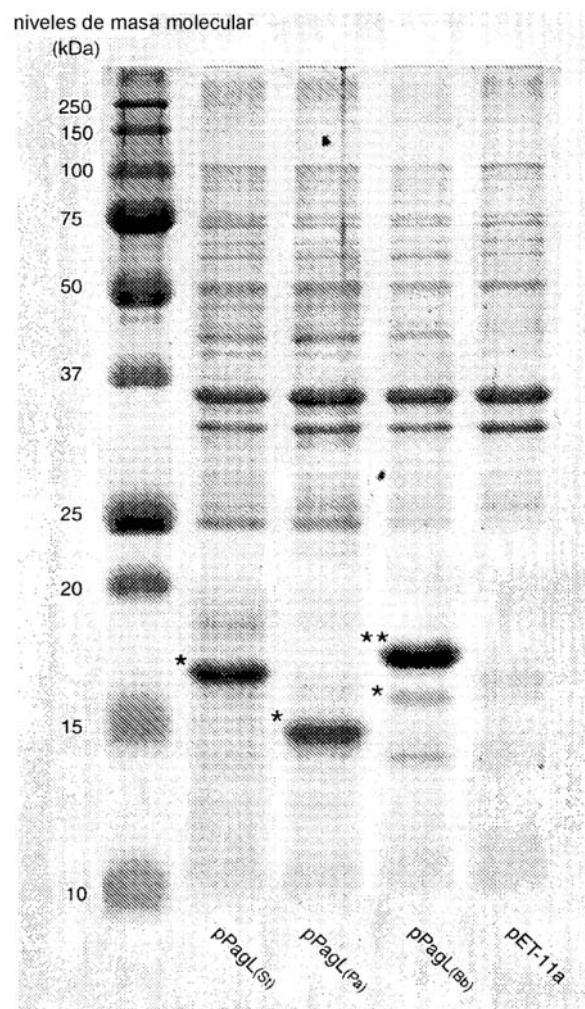


Fig 4

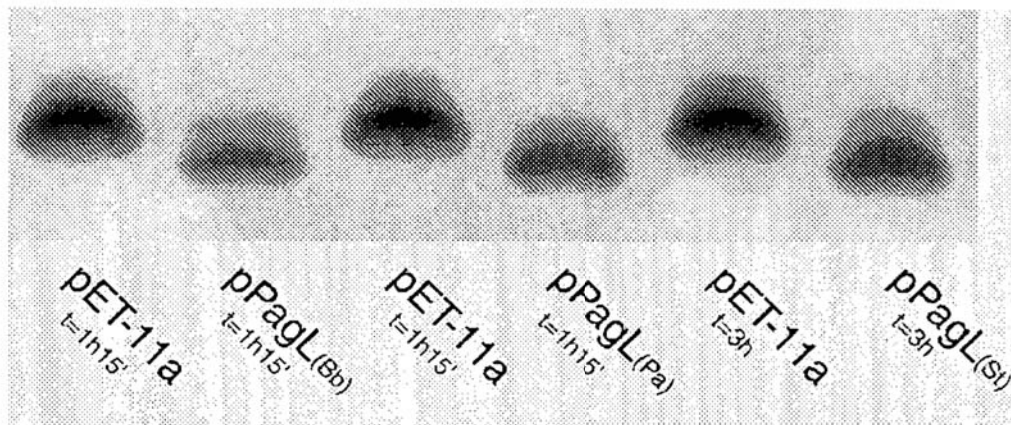


Fig 5

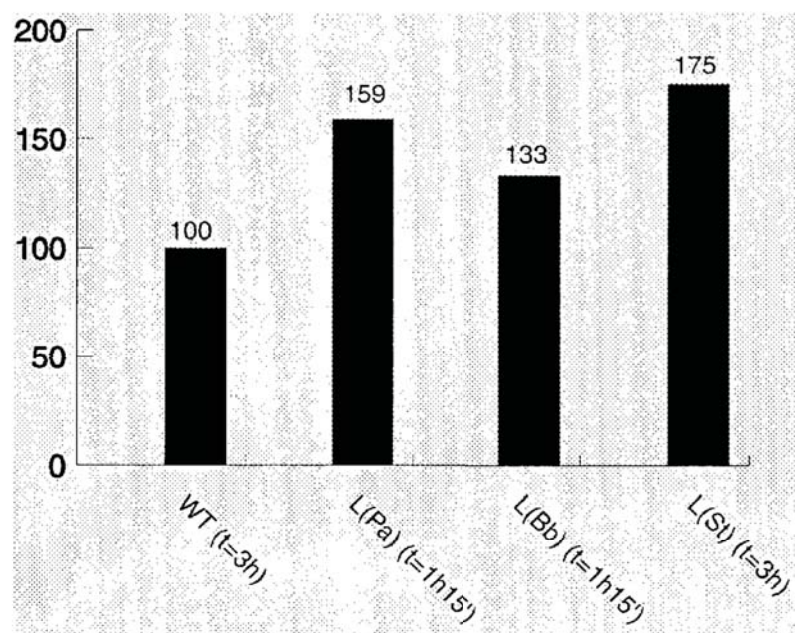


Fig 6a

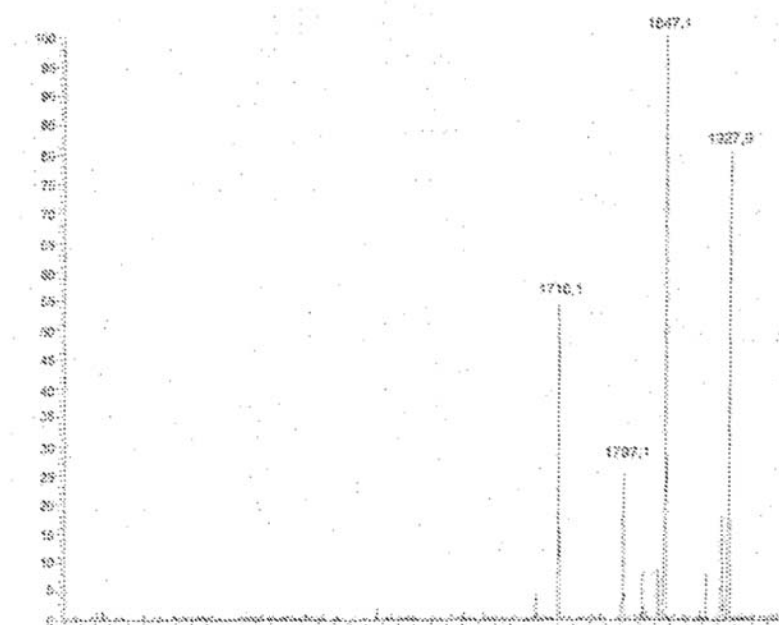


Fig 6b

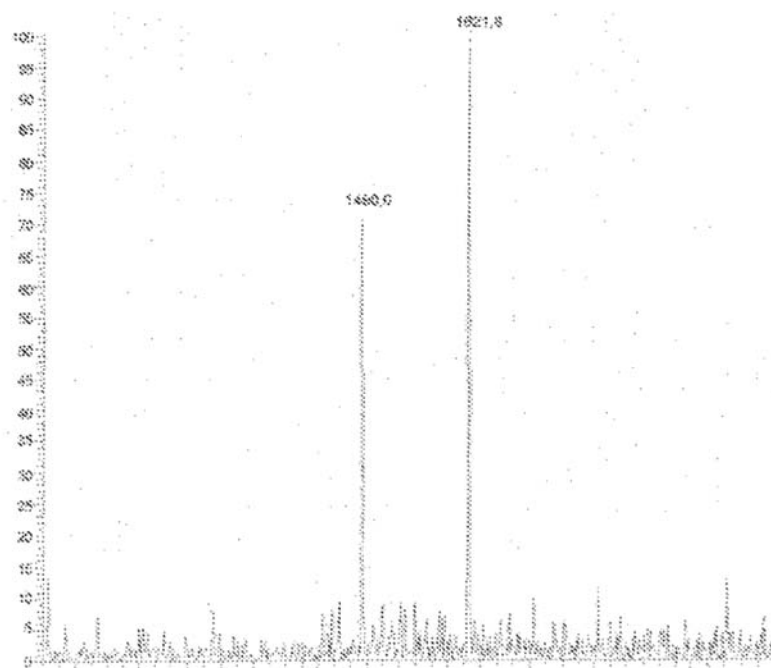


Fig 6c

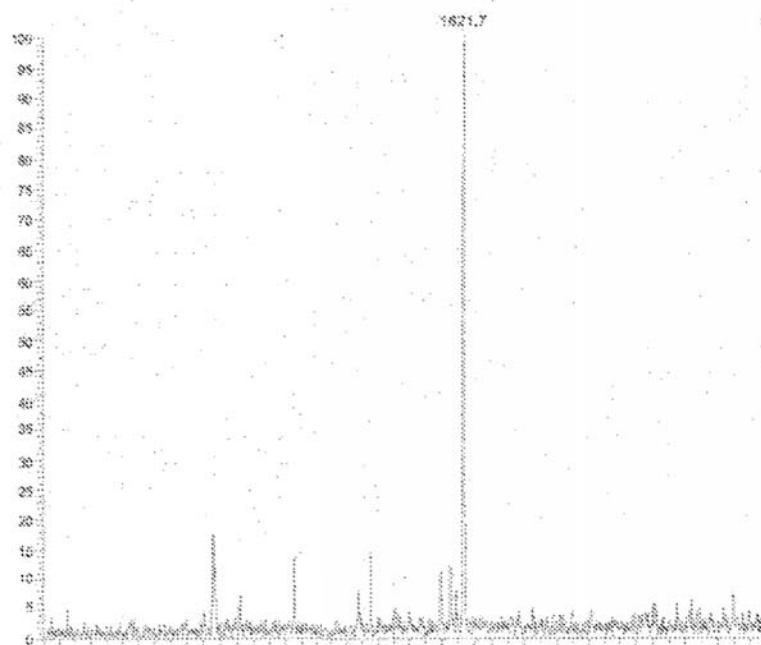


Fig 6d

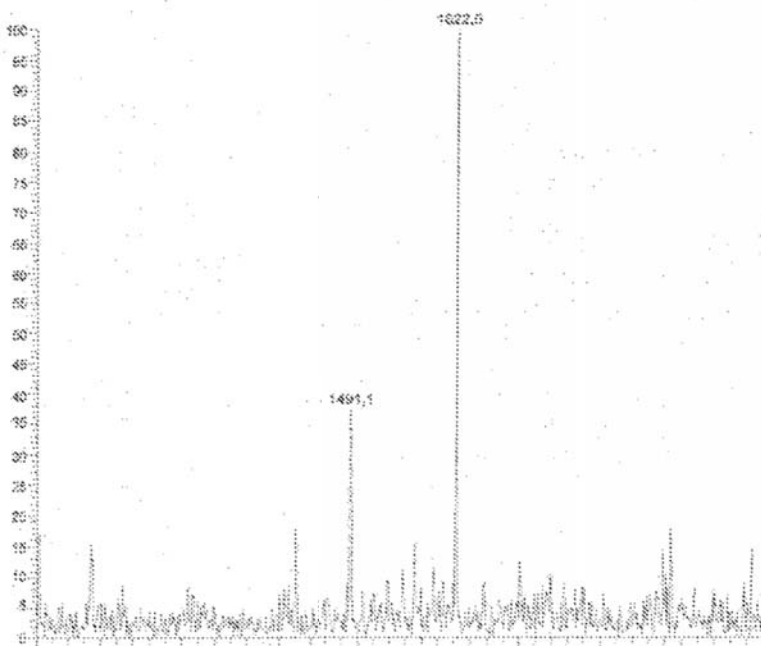
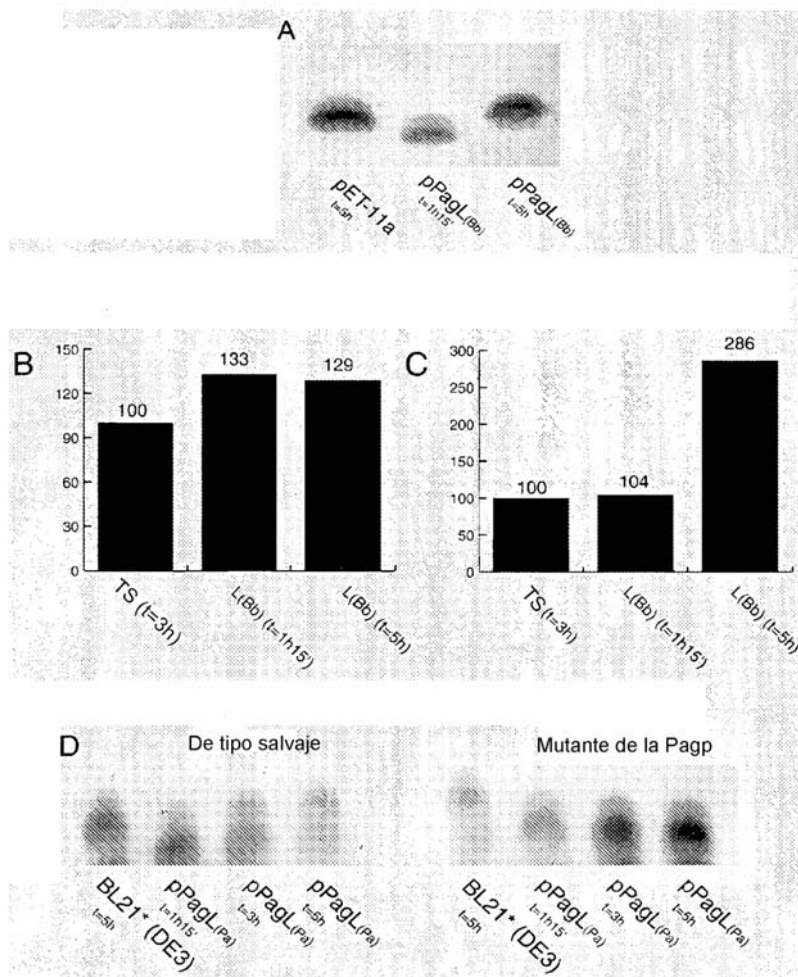


Fig 7



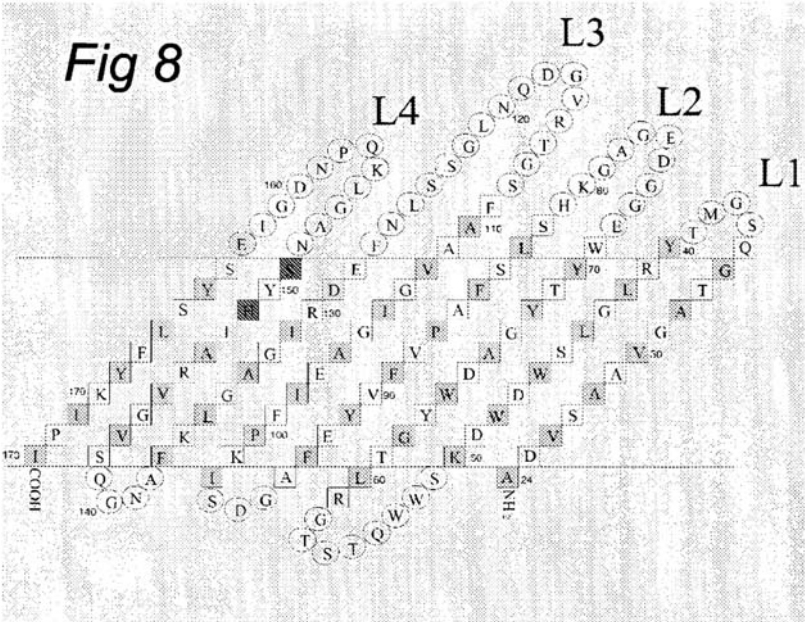


Fig 9a

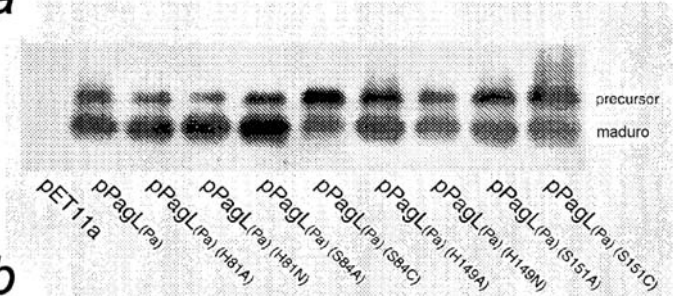


Fig 9b

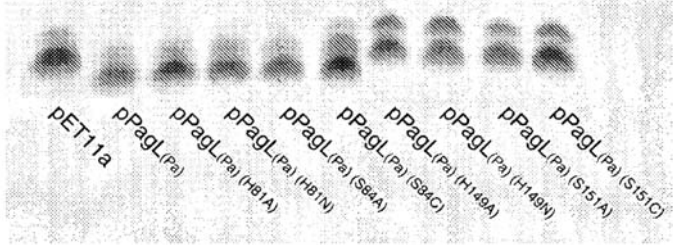


Fig 10a

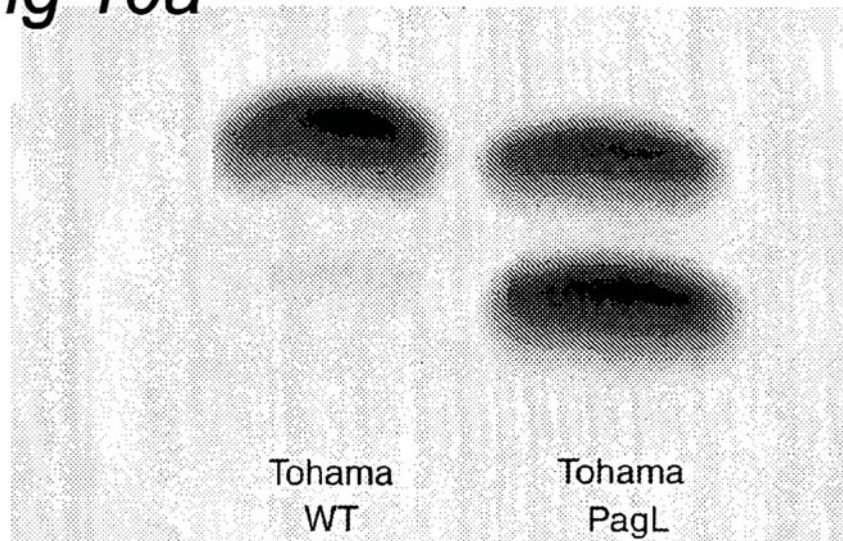


Fig 10b

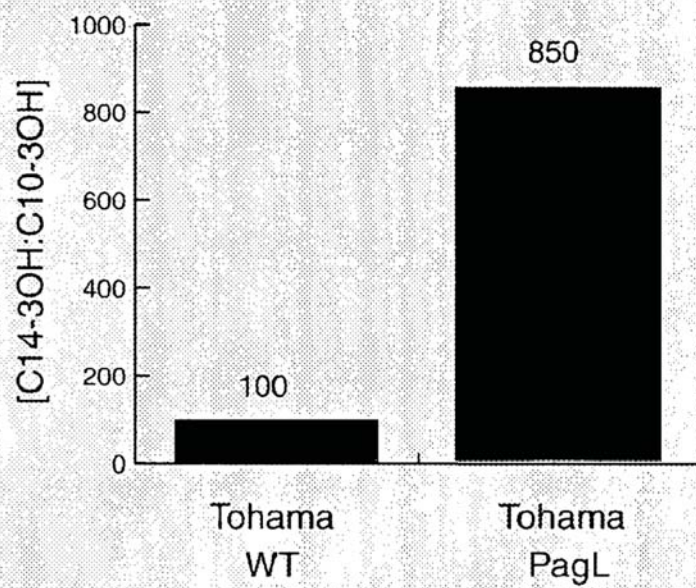


Fig 11a

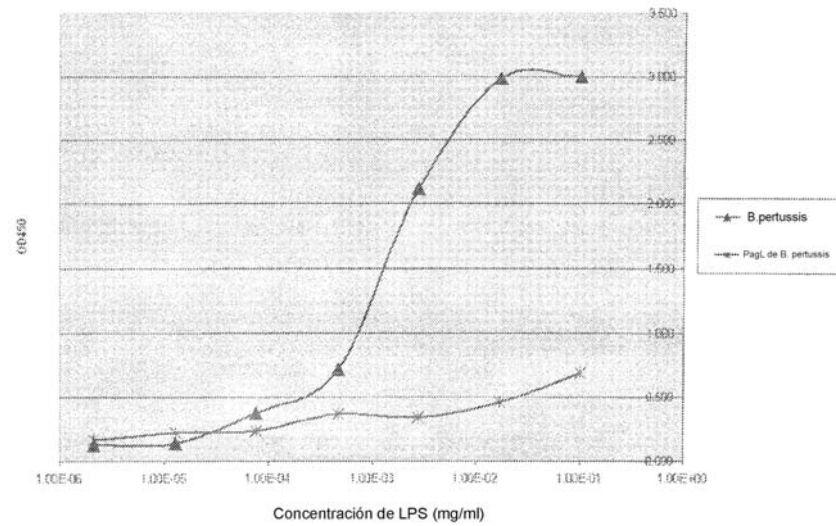


Fig 11b

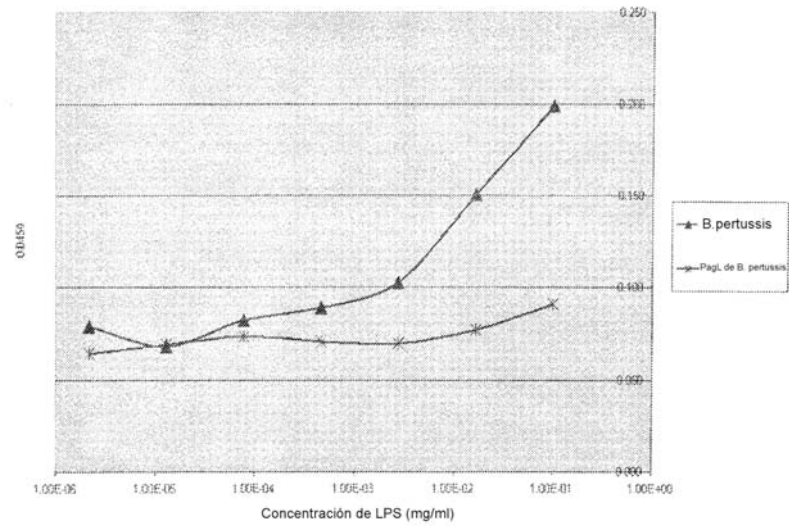


Fig 12

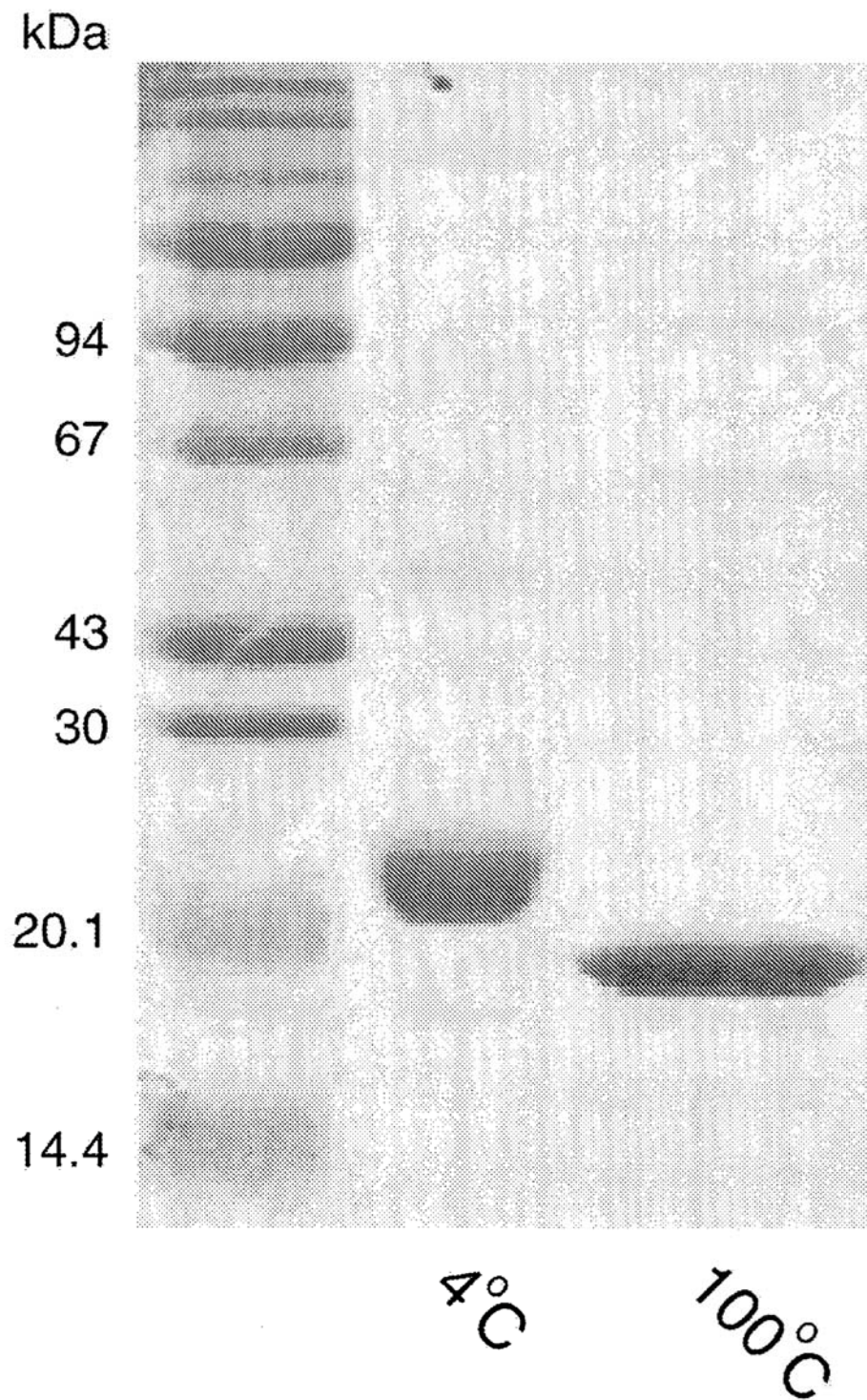


Fig 13a

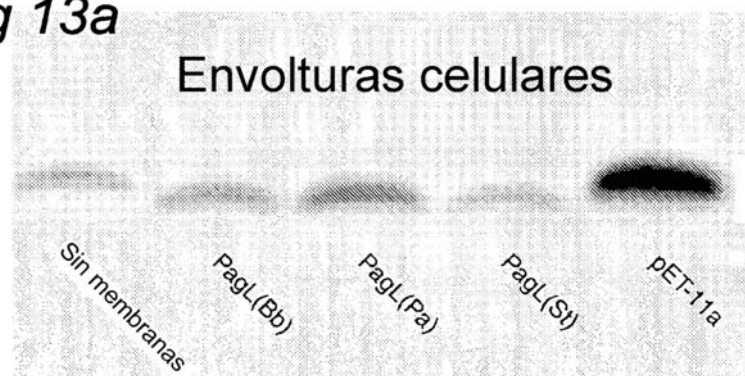


Fig 13b

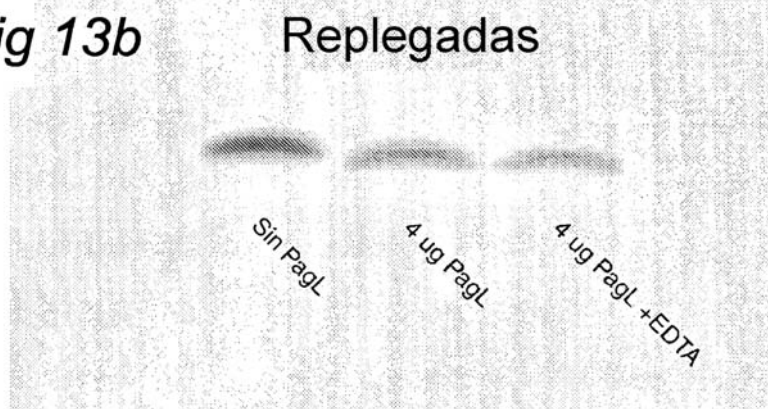


Fig 14

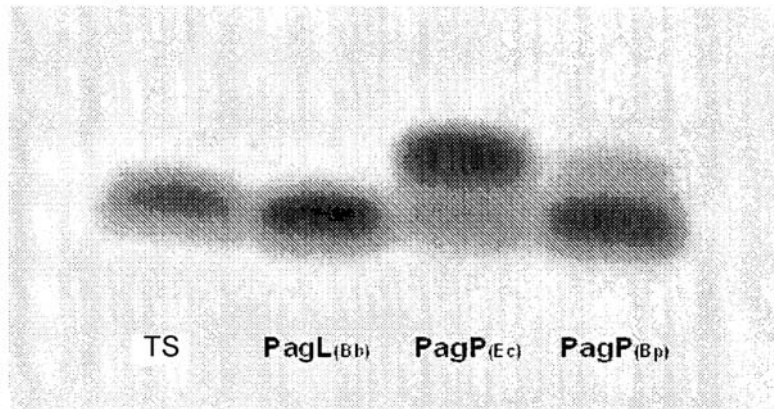


Fig 15

