

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 071**

51 Int. Cl.:

A61K 39/104 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012** **E 12794646 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016** **EP 2800584**

54 Título: **Dianas novedosas de Acinetobacter baumannii**

30 Prioridad:

30.11.2011 EP 11191320

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

27.04.2016

73 Titular/es:

ARIDIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
5941 Optical Court
San Jose, CA 95138, US

72 Inventor/es:

URWYLER, SIMON;
HAAKE, MARKUS y
RUDOLF, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 568 071 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

Dianas novedosas de *Acinetobacter baumannii*

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a polipéptidos antigénicos expresados durante una infección por un organismo patógeno, tal como *Acinetobacter*, y composiciones que comprenden estos polipéptidos. La invención se refiere adicionalmente a su uso en el tratamiento, prevención o detección de una infección bacteriana, en particular, el uso de los polipéptidos antigénicos en la vacunación. La invención se refiere adicionalmente a anticuerpos dirigidos a dichos polipéptidos antigénicos.

TECNICA ANTERIOR

15 Las *Acinetobacter spp.* Se distribuyen ampliamente en la naturaleza. El género *Acinetobacter* se divide en aproximadamente 20 especies. Son bacterias gramnegativas, oxidasa negativas, no móviles, nitrato negativas, no fermentadoras.

20 *Acinetobacter baumannii* es la especie aislada más frecuentemente en este género. Pueden sobrevivir en diversas superficies (tanto húmedas como secas) en el entorno hospitalario. Únicamente se ha reconocido recientemente a *A. baumannii* como un patógeno nosocomial. Las técnicas invasivas, tales como cirugía, y la ventilación pulmonar en combinación con pacientes inmunodeficientes, han dado lugar a la importancia incrementada del género *Acinetobacter* como patógenos nosocomiales.

25 Las frecuencias de infecciones tanto nosocomiales como adquiridas de manera extrahospitalaria se han incrementado de manera constante con los años. Además, el tratamiento de estas infecciones se ha vuelto más difícil debido a la aparición de cepas resistentes a multifármacos.

30 Las infecciones por *Acinetobacter* se diagnostican normalmente a través de síntomas durante infecciones por bacterias aerobias en combinación con cultivos microbianos de fluidos corporales que se originan a partir del tejido infectado. A continuación, las bacterias cultivadas se identifican *in vitro*. Se ha explorado y aplicado una variedad de procedimientos genotípicos para investigar la diversidad o filogenia en el género. Estos procedimientos incluyen la obtención de huellas genéticas de alta resolución con AFLP, PCR-RFLP con digestión de secuencias amplificadas por PCR y análisis de diversas secuencias de ADN.

35 Uno de los avances más importantes en la historia de la medicina reciente es el desarrollo de vacunas que proporcionan protección profiláctica a partir de una amplia variedad de organismos patógenos. Muchas vacunas están producidas por patógenos inactivados o atenuados que se inyectan en una persona. La persona inmunizada responde produciendo tanto una respuesta humoral (anticuerpo) como celular (linfocitos T citolíticos y/o cooperadores y/o reguladores, etc.)

45 Sin embargo, el uso de organismos atenuados en vacunas para determinadas enfermedades es problemático debido a la carencia de conocimiento con respecto a la patología de la afección y la naturaleza de la atenuación. Una alternativa al uso de patógenos inactivados o atenuados es la identificación de epítopos de patógenos a los que el sistema inmunitario es particularmente sensible. A este respecto, muchas toxinas patógenas producidas por organismos patógenos durante una infección son particularmente útiles en el desarrollo de vacunas que protegen a la persona de un organismo patógeno particular.

50 Una denominada vacuna de subunidades presenta un antígeno para el sistema inmunitario sin introducir partículas patógenas, tales como virus, completos o de otro modo. Dichas vacunas de subunidades se producen mayoritariamente mediante la expresión recombinante de un antígeno en un organismo huésped, la purificación a partir del organismo huésped y la preparación de una composición de vacuna.

55 En general, las especies *Acinetobacter* se consideran no patógenas para personas sanas. La importancia clínica reconocida recientemente de las especies *Acinetobacter* ha suscitado interés en entender las diversas bacterias y componentes huésped implicados en la patogénesis de estas enfermedades. El conocimiento de la interacción desempeña un importante papel en el control de la infección. Las infecciones por *Acinetobacter* implican normalmente sistemas de órganos que tienen un alto contenido en líquidos (por ejemplo, las vías respiratorias, el LCR (líquido cefalorraquídeo), el líquido peritoneal, las vías urinarias), manifestándose como neumonía nosocomial, infecciones asociadas con diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA), o bacteriuria asociada a catéter.

60 Pantophlet *et al.* describen antígenos O de lipopolisacáridos (LPS) de *Acinetobacter* y anticuerpos correspondientes para la identificación de cepas aisladas de *Acinetobacter* (Pantophlet R. *et al.*, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 9, 60-65 (2002)).

65 Tomarasz *et al.* identificaron el complejo génico *csuAB* policistrónico y mostraron su importancia en la producción y

ensamblaje de pilosidades, así como en la posterior formación de biopelículas, por ejemplo, en superficies hospitalarias y dispositivos médicos (Tomarasz A.P. *et al.*, Microbiology, 154, 3398-3409 (2008)).

5 El documento US 6.562.958 divulga aproximadamente 4000 secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos relacionadas con *A. baumannii*, sin embargo, mayoritariamente están con función no identificada. El documento US 6.713.062 divulga *OmpA* y proteína similar a *OmpA* que pueden estimular la expresión génica de IL-8 y gastrina.

10 Sin embargo, no se han desarrollado vacunas hasta la fecha. Las vacunas basadas en proteínas expuestas en la superficie y secretadas frente a infecciones por *Acinetobacter* aún no se han desarrollado debido a una carencia de disponibilidad de dianas viables.

15 Por lo tanto, existe una gran necesidad médica en la técnica de obtener polipéptidos antigénicos expresados durante una infección por *Acinetobacter*, preferentemente *A. baumannii*, y que sean adecuados para el desarrollo de vacunas y que sean viables para la producción de anticuerpos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico.

Se han desarrollado una serie de procedimientos para identificar polipéptidos antigénicos potenciales a partir de diversos patógenos, sin embargo, no proporcionan una herramienta general para comprobar la idoneidad de dichos polipéptidos como diana inmunógena en una composición de vacuna.

20 Por consiguiente, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar dianas de *A. baumannii* clínicamente predominantes que se vayan a usar en una composición de vacuna y/o para la producción de anticuerpos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico valiosos.

25 El problema técnico se resuelve mediante la provisión de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos antigénicos y anticuerpos o fragmentos de unión a anticuerpo que se unen a los polipéptidos antigénicos.

SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende al menos un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

a) un polinucleótido que tiene la secuencia de ácidos nucleicos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15;

35 b) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por el polinucleótido de (a), en el que dicho fragmento tiene actividad inmunoestimuladora;

40 c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y que tiene actividad inmunoestimuladora;

d) un polinucleótido que es al menos un 80 % idéntico al polinucleótido de (a), y que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora;

45 e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora; y

50 f) un polinucleótido que es complementario a la longitud completa de un polinucleótido de cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora.

Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico es ADN genómico.

55 En un modo de realización de la invención, dicho polipéptido deriva del género *Acinetobacter*, preferentemente dicho polipéptido deriva de la especie *Acinetobacter baumannii*.

En otro modo de realización de la invención, la composición de vacuna comprende adicionalmente un adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 La presente invención proporciona un polipéptido antigénico que consiste en una secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16; o fragmento, análogo o derivado funcional del mismo, en el que dicho fragmento, análogo o derivado funcional tiene actividad inmunoestimuladora.

65 En modos de realización adicionales, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido antigénico de la invención, un vector de expresión que comprende dicha molécula de ácido nucleico y una célula huésped que comprende dicho vector y/o dicha molécula de ácido nucleico de la invención.

5 En un modo de realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que une específicamente el polipéptido antigénico de la invención, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede inducir una función efectora hacia *Acinetobacter baumannii*. El anticuerpo provisto por la invención es policlonal o monoclonal; preferentemente humano. Dicho anticuerpo se puede modificar de manera N terminal, interna y/o C terminal, tal como mediante oligomerización y conjugación a un fármaco y/o un marcador.

10 El anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede inducir preferentemente una función efectora hacia *Acinetobacter baumannii*. Lo más preferentemente, el anticuerpo monoclonal de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo une específicamente el motivo de consenso de epitopo PVDFTVAI mostrado en SEQ ID NO: 36.

15 El anticuerpo monoclonal de la invención se produce preferentemente a partir de un linfocito B humano o un hibridoma obtenido por fusión de dicho linfocito B humano con una célula de mieloma o heteromiéloma. De esta manera, la invención proporciona un hibridoma que puede producir el anticuerpo monoclonal de la invención. La invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de la invención y un vector que comprende dicho ácido nucleico, así como una célula huésped que comprende dicho vector y/o dicho ácido nucleico.

20 En un modo de realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal de la invención que comprende cultivar el hibridoma como se define en el presente documento en condiciones que permiten la secreción de un anticuerpo, y opcionalmente purificar el anticuerpo del sobrenadante de cultivo.

25 En un modo de realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización adicional, la presente invención proporciona una composición de diagnóstico que comprende el anticuerpo de la invención para detectar una infección bacteriana en un paciente. El anticuerpo de la invención se proporciona para su uso en el tratamiento, prevención y/o detección de una infección bacteriana en un mamífero; preferentemente un ser humano.

30 En un modo de realización adicional, la presente invención proporciona un polipéptido para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana provocada por *Acinetobacter* en un mamífero codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

35 a) un polinucleótido que tiene la secuencia de ácidos nucleicos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15;

40 b) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por el polinucleótido de (a), en el que dicho fragmento tiene actividad inmunoestimuladora;

c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y que tiene actividad inmunoestimuladora;

45 d) un polinucleótido que es al menos un 80 % idéntico al polinucleótido de (a), y que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora;

50 e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora; y

f) un polinucleótido que es el complemento de la longitud completa de un polinucleótido de cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora.

55 Preferentemente el mamífero es humano. En un modo de realización adicional de la presente invención, la infección bacteriana que se va a tratar, prevenir y/o detectar está provocada por *Acinetobacter baumannii*, dicha infección bacteriana puede ser adquirida en el hospital. Las composiciones de polipéptido antigénico para su uso de acuerdo con la invención pueden comprender adicionalmente un vehículo de administración; preferentemente un virosoma.

60 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los valores de IgG en sueros de pacientes con *A. baumannii* convalecientes (izquierda) y donantes de sangre corrientes seleccionados aleatoriamente (derecha).

65 Los polipéptidos antigénicos de acuerdo con la invención se expresaron de manera recombinante, se purificaron y se sometieron a prueba mediante ELISA con sueros de pacientes con *A. baumannii* convalecientes y donantes de sangre corrientes seleccionados aleatoriamente en diferentes diluciones. Los números en los gráficos reflejan el número de

sueros sometidos a prueba y que reaccionan con el polipéptido antigénico (A-H) a una dilución como se indica mediante los diferentes colores dados en la leyenda.

5 Los valores se definen como la dilución en suero más alta que genera una señal de ELISA específico para antígenos dos veces la señal del blanco correspondiente. La mayoría de los sueros de pacientes sometidos a prueba contienen anticuerpos frente a las dianas identificadas mediante la presente invención. Los sueros de pacientes contienen, en general, valores más altos en comparación con los donantes de sangre sanos. Para todos los antígenos, los sueros de pacientes individuales se pudieron identificar con valores de anticuerpos extremadamente altos (51/6400), lo que demuestra que los antígenos son inmunógenos en un ser humano y se expresan durante la infección. Esto indica claramente que estas dianas identificadas recientemente son viables para el desarrollo de vacunas y la generación de anticuerpos profilácticos/terapéuticos.

15 A: His-AB023 correspondiente a SEQ ID NO: 2; B: His-AB024 correspondiente a SEQ ID NO: 4; C: His-AB025 correspondiente a SEQ ID NO: 6; D: His-AB030 correspondiente a SEQ ID NO: 8; E: His-AB031L1 correspondiente a SEQ ID NO: 10; F: His-FimA correspondiente a SEQ ID NO: 12; G: His-CsuAB correspondiente a SEQ ID NO: 14; H: His-OmpA correspondiente a SEQ ID NO: 16.

La figura 2 muestra un ELISA de sueros de conejo.

20 Los conejos se inmunizaron con un polipéptido antigénico recombinante con marca his. El sangrado final y los preinmunosueros se sometieron a prueba por medio de ELISA en placas de ELISA recubiertas individualmente con los diferentes polipéptidos antigénicos. Además, los sangrados finales se sometieron a prueba por medio de ELISA en placas recubiertas con reactivos de control: OmpA con marca His que sirvió como control para A-G y His-CsuAB que sirvió como control para H. Las figuras muestran que la respuesta inmunitaria principal está provocada por la diana y no por la marca His que también está presente en el control. Se obtuvieron resultados comparables con un conjunto de conejos inmunizados por duplicado. Las diluciones de inmunosueros y preinmunosueros usadas fueron:

A: α -His-AB023 (1:6400); B: α -His-AB024 (1:6400); C: α -His-AB025 (1:6400); D: α -His-AB030 (1:25600); E: α -His-AB031L1 (1:12800); F: α -His-FimA (1:400); G: α -His-CsuAB (1:3200); H: α -His-OmpA (1:6400).

30 La figura 3 muestra un análisis de inmunotransferencia.

Se sometió a prueba la especificidad de los antisueros de conejo. Se prepararon lisados celulares de diversas cepas de *A. baumannii* (AB) y *P. aeruginosa* (PA) como controles negativos, respectivamente, las proteínas separaron en SDS-PAGE y se transfirieron sobre nitrocelulosa. Se usaron sueros de conejo frente a los diferentes polipéptidos (inmunosueros) y preinmunosueros a una dilución 1:1000 (detalles experimentales dados en el ejemplo 6).

35 Lisados bacterianos: 1: AB: ATCC19606 natural; 2: AB: ATCC19606 OmpA K.O; 3: AB: ATCC19606; CsuE K.O; 4: PA O11; 5: AB: AB-N; 6: AB: Luh8168; 7: AB: Ruh134; 8: AB: SAN;

40 Inmunosueros: α -His-AB023; B: α -His-AB024; C: α -His-AB025; D: α -His-CsuAB; E: α -His-OmpA; F: α -His-AB030; G: α -His-FimA; H: α -His-AB031 L1;

La figura 4 muestra otro análisis de inmunotransferencia.

45 Se sometió a prueba la especificidad del antisuero de conejo específico para el polipéptido FimA en el sobrenadante de cultivo. La figura 4 muestra una inmunotransferencia representativa de una cepa de *A. baumannii* (AB-no mucoide), una de *P. aeruginosa* (PA O11) y una de *E. coli* (DH5 α).

50 Se centrifugaron los cultivos de bacterias de durante la noche y las proteínas en el sobrenadante precipitaron. Los sedimentos (P) celulares y el sobrenadante (SN) precipitado de volúmenes de cultivo equivalentes se examinaron mediante análisis de inmunotransferencia para determinar la presencia de FimA usando antisuero de conejo α -His-FimA. Se analizaron un total de 29 cepas de *A. baumannii* mediante inmunotransferencia para determinar la presencia de FimA en el sobrenadante así como el sedimento bacteriano. Un 45 % contenía cantidades detectables en el sedimento celular, mientras un 55 % contenía cantidades detectables en el SN.

55 AB: cepa de *A. baumannii* AB-NM (no mucoide); PA: *P. aeruginosa* O11; EC: *E. coli* DH5 α

La figura 5 muestra otro análisis de inmunotransferencia.

60 La especificidad de los sueros humanos seleccionados fue sometida a prueba mediante análisis de inmunotransferencia. Las proteínas recombinantes se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron sobre nitrocelulosa. Se usaron diferentes sueros de pacientes (A-F) frente a los diferentes polipéptidos (1-7) a una dilución de 1:500 (los detalles experimentales se dan en el ejemplo 6). Para excluir artefactos de anticuerpos dirigidos frente a la marca His, se eligieron combinaciones de antígenos recombinantes que incluían con cada inmunotransferencia una proteína con

marca His como control negativo que no se reconoce por el suero del paciente correspondiente.

Proteínas recombinantes: 1-His-AB023; 2-His-AB024; 3-His-AB025; 4-His- AB030; 5-His-FimA; 6-His-CsuAB; 7 -His-OmpA; 8- AB031-L1 (sueros humanos no identificados todavía para AB031 L1 en inmunotransferencias).

5 La figura 6 muestra un análisis de FACS; en el que

10 la imagen A muestra el análisis de FACS de cepas de *A. baumannii* ATCC19606 natural (wt), OmpA KO (OmpA-) y CsuE KO (CsuE-) usando sueros de pacientes a una dilución de 1:200. La población bacteriana se seleccionó usando dispersión frontal y lateral y se midieron 20.000 bacterias;

15 la imagen B muestra el análisis de FACS de cepas de *A. baumannii* ATCC19606 natural (wt) usando los mismos sueros de pacientes y configuración del instrumento como en A. Se usó el suero del paciente sin (S) o con OmpA recombinante (S+rOmpA) como agente inhibidor; y

20 la imagen C muestra un análisis de inmunotransferencia usando sueros de pacientes de lisados celulares de *A. baumannii* ATCC19606 natural (1), OmpA KO (2) como control negativo y CsuE KO (3). La tinción de Ponceau de transferencia confirma cargas iguales de lisados celulares. La banda de proteína de OmpA en lisados celulares de ATCC19606 natural y CsuE KO es evidente como también con la tinción de Ponceau.

La figura 7 se refiere a otro análisis de FACS; en el que

25 la imagen A muestra el análisis de FACS de *A. baumannii*, cepas ATCC 19606 (wt) y CsuE- KO (CsuE-) con inmunosuero (IS) de conejo α CsuAB marcado con fluorescencia indirectamente o preinmunosuero (PIS) correspondiente. Como anticuerpo secundario, se usó anti-IgG de conejo caprino marcado con FITC. Se prepararon los gráficos de histogramas que transfieren la intensidad de señal de fluorescencia al número de acontecimientos a partir de bacterias seleccionadas. La población bacteriana se seleccionó usando dispersión frontal y lateral y se midieron 5.000 bacterias;

30 la imagen B muestra el análisis de FACS de diferentes cepas de *A. baumannii* (ATCC 19606, CsuE KO, Luh9415, Ruh134, Ruh875). El gráfico muestra el porcentaje de bacterias que se marcaron con fluorescencia indirectamente con inmunosuero (IS) de conejo α CsuAB o preinmunosuero (PIS) correspondiente. Las bacterias se consideraron positivas con una intensidad de señal FL1-H de >20 .

35 La figura 8 muestra los resultados de un ensayo de aglutinación y un análisis de inmunofluorescencia; en la que la imagen A muestra una aglutinación de *A. baumannii* viva (cepa ATCC19606) usando 1,5 mg/ml de IgG de conejo total, purificada a partir de inmunosuero de conejo α CsuAB o suero de conejo sin exposición previa; y

40 la imagen B muestra un análisis de inmunofluorescencia de *A. baumannii* (cepas ATCC 19606 y CsuE KO). Se cultivaron bacterias en portaobjetos de vidrio durante 24 h en medio de cultivo celular (IMDM) que contenía FCS al 10 %. Las bacterias se marcaron con DAPI para localizar el ADN bacteriano (figuras superiores) y se marcaron con fluorescencia indirectamente usando inmunosuero (IS) de conejo α CsuAB o preinmunosuero (PIS) correspondiente con anticuerpo secundario marcado con FITC (figuras inferiores).

45 La figura 9 muestra un ensayo bactericida y un análisis de inmunotransferencia; en la que

50 las imágenes A y B muestran el ensayo bactericida. Los gráficos muestran el número de unidades formadoras de colonias (ufc) después de la incubación con IgG purificada a partir de inmunosuero α CsuAB de conejo (barras grises) o a partir de suero de conejo sin exposición previa (barras negras); en los que A se refiere al aumento exponencial de *A. baumannii*, ATCC 19606 y CsuE KO (CsuE-), que se incubaron con anticuerpo (0,5 μ g/pocillo) durante 20 minutos a 37 °C. Como fuente de complemento se añadió suero de cría de conejo (BRS) y se incubó durante 2 h. Eventualmente se cuantificaron las ufc plaqueando en LBA; y

55 B se refiere al aumento exponencial de *A. baumannii* Ruh 134, que se incubó con anticuerpo (5 μ g/pocillo) durante 20 minutos a 37 °C. Como fuente de complemento se añadieron suero de cría de conejo (BRS) o como control BRS inactivado con calor (HBRS) y se complementó con o sin células HL-60 (+HL60) transformadas previamente a neutrófilos. Las mezclas se incubaron adicionalmente durante 2 h. Eventualmente se cuantificaron las ufc plaqueando en LBA.

60 A y B: las barras de error de muestran la desviación estándar de tres pocillos independientes; la prueba de la t de Student (igual varianza, bilateral) muestra la significación estadística de $<0,05$ para:

ATCC19606/ α CsuAB, en comparación con CsuE-/ α CsuAB; ATCC19606/ α CsuAB en comparación con ATCC19606/IgG indiferenciada; Ruh134+BRS+HL60/ α CsuAB, en comparación con

Ruh134+HBRS+HL60 / α CsuAB; Ruh134+BRS+HL60/ α CsuAB en comparación con Ruh134+BRS+HL60/ IgG indiferenciada; Ruh134+BRS / α CsuAB en comparación con Ruh134+HBRS / α CsuAB; Ruh134+BRS / α CsuAB en comparación con Ruh134+BRS/ IgG indiferenciada.

5 La imagen C muestra un análisis de inmunotransferencia de *A. baumannii* natural y CsuE KO de la cepa ATCC19606; y

10 la figura 10 muestra el resultado de un ensayo de interacción para FimA; en el que la IgG total (10 μ g) de inmunosuero de conejo FimA (1) se recubrió sobre microesferas de proteína A (20 μ l de volumen de lecho) y se usó para capturar FimA natural a partir del sobrenadante de cultivo de *A. baumannii* (0,4 ml) de la cepa Luh9415, que se sabe que secreta FimA en el SN. Se usaron cantidades iguales de IgG total de suero de conejo sin exposición previa (2) como control negativo. Las proteínas capturadas totales se liberaron en tampón de muestra de SDS-PAGE hirviendo durante 10 min y se separaron un 7 % mediante SDS-PAGE. Se visualizó FimA natural mediante análisis de inmunotransferencia usando inmunosuero α FimA a una dilución de 1:1000.

15 La figura 11 muestra la inmunización pasiva con inmunosueros de conejo CsuAB.

20 Los ratones neutropénicos se infectaron con *A. baumannii* después de inyección i.p. bien con 0,15 ml de inmunosuero (líneas continuas) o un volumen igual de suero de un animal sin exposición previa (líneas discontinuas). Se registró la supervivencia de los ratones durante 4-5 días. La virulencia de la cepa de *A. baumannii* varió entre diferentes cepas y fechas de ejecuciones. Los experimentos B y C se realizaron en paralelo, mientras que el experimento mostrado en A se realizó en una fecha separada.

25 La imagen A muestra la cepa AB-M, 10 animales por grupo; la imagen B muestra la cepa AB-M, 14 animales por grupo, y la imagen C muestra la cepa AYE, 14-15 animales por grupo.

30 La figura 12 muestra un experimento de inmunización activa. Mortalidad en un modelo para modelo de neumonía inducida por *A.baumannii* después de la inmunización activa. Los ratones se vacunaron con antígenos (líneas continuas A-F: A: AB025-9 animales, B: AB030 -10 animales, C: AB031L1 -9 animales, D: FimA-9 animales, E: CsuAB -10 animales, F: OmpA-9 animales) y luego se indujo neumonía mediante inoculación endotraqueal de *A.baumannii* (cepa AB-M). Como control, se vacunó un grupo de ratones únicamente con el adyuvante (línea discontinua A-G; 10 animales). En un segundo grupo de control, se usó PBS en lugar de una vacuna o adyuvante (línea continua G; 9 animales). Para todos los antígenos sometidos a prueba (A-F), se observó un efecto beneficioso de la vacuna en comparación con el grupo de control con adyuvante. Se observó un efecto estadísticamente significativo para AB030, mientras que los otros antígenos justamente no alcanzaron el umbral de un 5 % para la significación estadística. Dos motivos pueden contribuir a este efecto. En primer lugar, el bajo número de animales y, en segundo lugar, la mortalidad más baja de los grupos de control (G), en comparación con experimentos previos. Lo más probable es que la mortalidad fuera más baja a causa de que los animales en experimentos de inmunización activa son mucho mayores que los usados en la inmunización pasiva. Esto se debe a la duración del protocolo de inmunización activa de varias

40 semanas.

45 La figura 13 muestra un experimento de inmunización pasiva. Los ratones se volvieron temporalmente neutropénicos mediante inyección intraperitoneal de ciclofosfamida en los días 4 y 3 antes de la inoculación de *A. baumannii*. En el día 0, 3 h antes de la inoculación de *A. baumannii*, los ratones se vacunaron pasivamente por vía intraperitoneal con bien 0,15 ml de antisuero de conejo, suero de conejo sin exposición previa o PBS. Se indujo neumonía análoga al protocolo de inmunización activa. Se comprobaron la supervivencia, puntuación clínica y peso corporal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende al menos un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en

55 a)un polinucleótido que tiene la secuencia de ácidos nucleicos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15;

b)un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por el polinucleótido de (a), en el que dicho fragmento tiene actividad inmunoestimuladora;

60 c)un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y que tiene actividad inmunoestimuladora;

d)un polinucleótido que es al menos un 80 % idéntico al polinucleótido de (a), y que codifica un polipéptido que tiene

actividad inmunoestimuladora;

e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora; y

f) un polinucleótido que es complementario a la longitud completa de un polinucleótido de cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora.

Los polipéptidos de la invención, como se refieren en el presente documento, se resumen en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	Molécula de ácido nucleico
AB023	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 1
AB024	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 3
AB025	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 5
AB030	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7
AB031	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 9
FimA	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 11
CsuAB	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 13
OmpA	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 15

El término "fragmento" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier fragmento del polipéptido como se define en el presente documento que tiene actividad inmunoestimuladora. El fragmento tiene una longitud mínima de al menos 4, 8, 15, 20, 30, 50, 100 aminoácidos. Es preferente que el fragmento comprenda un epítipo de 6-8 aminoácidos de longitud, una longitud mínima de 4-5 aminoácidos y una longitud máxima de 15 aminoácidos con respecto a la longitud total de la proteína representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16.

Un "análogo de un polipéptido" pretende hacer referencia a una molécula sustancialmente similar en función bien a toda la molécula o a un fragmento de la misma.

El término "derivado funcional" de un polipéptido quiere decir un polipéptido con una estructura similar y la misma función biológica.

El término "actividad inmunoestimuladora" como se usa en el presente documento se refiere a inducir una respuesta inmunitaria inicial con respecto a un antígeno. Preferentemente, el polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora como se define en el presente documento puede inducir una respuesta inmunitaria frente a una infección con *Acinetobacter*, lo más preferentemente el polipéptido de la invención puede inducir una respuesta inmunitaria frente a una infección con *A. baumannii*. El término 'respuesta inmunitaria' como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en el contenido de anticuerpos en cualesquiera fluidos corporales, que sean reactivos con los polipéptidos, así como cambios en las respuestas celulares con respecto a los polipéptidos, tales como linfocitos T y células del sistema inmunitario innato, así como cambios en marcadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas y otros marcadores inmunológicos indicativos de una modulación de las funciones inmunitarias normales. Se comprobó la respuesta inmunitaria frente a estos organismos patógenos con ELISA, inmunotransferencia y similares.

Las "identidades de secuencia" como se hace referencia en el presente documento de polinucleótidos y polipéptidos relacionados se pueden determinar por medio de procedimientos conocidos. Se concibe una identidad de secuencia de los polipéptidos relacionados a los polipéptidos antigénicos representados en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 de al menos un 75 %, más preferentemente un 80 % o un 85 %, y lo más preferente un 90 % o un 95 %. Como norma, se usan programas informáticos con algoritmos que tienen en cuenta los requerimientos especiales. Para los propósitos de la presente invención, el programa informático usado para la determinación de la identidad entre dos secuencias es BLASTP (para la comparación de secuencias de aminoácidos) y BLASTN (para la comparación de secuencias de nucleótidos), como se describe, por ejemplo, por Altschul S *et al.*, Nucl Acid Res 25: 3389-3402 (1997). Se pueden obtener los programas BLAST a partir del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) y a partir de otras fuentes (por ejemplo, BLAST Handbook, Altschul S *et al.*, NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul S *et al.*, J. Mol. 215: 403-410 (1990)). Para los propósitos de la presente invención, se usa el algoritmo de BLASTN y BLASTP con la siguiente configuración predeterminada:

BLASTN: Parámetros de puntuación: Puntuaciones de emparejamiento/desemparejamiento 1, -3; Costes por huecos:

Existencia: 5, Extensión: 2; Filtros y ocultación: regiones de baja complejidad seleccionado; ocultar para tabla de resultados únicamente seleccionado; ocultar letras minúsculas no seleccionado

BLASTP: Parámetros de puntuación: Matriz: BLOSUM62; Costes por huecos: Existencia: 11, Extensión: 1; Ajustes de composición: datos estadísticos basados en composición 2; Filtros y ocultación: ninguno seleccionado; Opciones avanzadas de programa; -G Coste por abrir hueco [número entero]; predeterminado = 5 para nucleótidos 11 proteínas; -E Coste por extender hueco [número entero]; predeterminado = 2 nucleótidos 1 proteína; -q Penalización por desemparejamiento de nucleótidos [número entero]; predeterminado = -3; -r recompensa por emparejamiento de nucleótidos [número entero]; predeterminado = 1; -valor de e esperado [real]; predeterminado = 10; -W longitud de palabra [número entero]; predeterminado = 11 nucleótidos 3 proteínas; -y Reducción (X) para extensiones de BLAST en bits (predeterminado si es cero); predeterminado = 20 para BLASTN 7 para otros programas, -X valor de reducción X para alineamiento con huecos (en bits); predeterminado = 15 para todos los programas excepto para BLASTN para el que no se aplica; -Z valor de reducción X para alineamiento con huecos (en bits); 50 para BALSTN 25 para otros programas.

Para la comparación de secuencias, se usa la secuencia de polipéptidos completa (SEQ ID NO: 2 o 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16, respectivamente) como la secuencia con la que se compara una secuencia relacionada. Específicamente, para determinar la identidad de un polipéptido con homología desconocida, por ejemplo, con respecto al polipéptido con SEQ ID NO: 2 de acuerdo con la invención, la secuencia de aminoácidos de dicho primer polipéptido se compara con la secuencia de aminoácidos del polipéptido mostrada en SEQ ID NO: 2), a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 2. De forma similar, para determinar la identidad de un polinucleótido con homología desconocida, por ejemplo, con respecto al polinucleótido con SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la invención, la secuencia de ácidos nucleicos de dicho primer polinucleótido se compara con la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 1), a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1.

Se divulgan "condiciones rigurosas" estándar para la hibridación en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (2000). Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares incluyen lavados con 0,1 x SSC / SDS al 0,1 % durante 15 min a 68 °C.

La presente invención proporciona una composición de vacuna como se define anteriormente, en la que la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido es ADN genómico.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención se pueden amplificar por PCR a partir de ADN genómico de una cepa de *A. baumannii* usando cebadores que contienen sitios de restricción apropiados para la clonación.

De acuerdo con la presente invención, la composición de vacuna comprende al menos un polipéptido en la que dicho polipéptido deriva del género *Acinetobacter*.

Más preferentemente, la composición de vacuna comprende al menos un polipéptido en la que dicho polipéptido deriva de la especie *Acinetobacter baumannii*.

Los términos "*Acinetobacter baumannii*" o "*A. baumannii*" como se usan en el presente documento se refieren a la especie *Acinetobacter baumannii* como se clasifica en *Acinetobacter Molecular Biology*, 2008, Ed. Ulrike Gerischer, Caister Academic Press. Son ejemplos las cepas de *A. baumannii* SDF, AYE, ATCC 19606, ACICU Ruh134, Ruh875, AB-M, AB-NM y SAN, cuyas referencias y fuentes se describen en la tabla 6. Se pueden obtener referencias e información con respecto a la taxonomía y cepas en la que puede recibirse en la página de inicio de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=470&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>).

A. baumannii provoca diferentes tipos de infecciones incluyendo, entre otras, neumonía, bacteriemia e infecciones de la piel y partes blandas. Durante las últimas décadas *A. baumannii* se ha convertido en un patógeno de creciente importancia clínica debido al incremento global en la incidencia de infecciones provocadas por este organismo. Las infecciones provocadas por este patógeno han sido especialmente problemáticas en pacientes que reciben ventilación mecánica y pacientes con quemaduras. *A. baumannii* puede provocar brotes epidémicos en unidades de cuidados intensivos y unidades de quemados/traumatología, que supuestamente están provocados por el paso del organismo desde las personas infectadas o colonizadas y el equipo hospitalario contaminado a los pacientes no infectados.

Los resultados mostrados en la tabla 2 a continuación demuestran que las dianas identificadas mediante la presente invención son representativas de todas las cepas aisladas clínicas de *A. baumannii* sometidas a prueba hasta el momento. La cepa SDF representa la única cepa de *A. baumannii* que no es una cepa aislada clínica, sino que fue aislada a partir de piojos del cuerpo. Esta cepa carece de los genes para FimA y CsuAB.

La tabla 2 a continuación muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos de proteínas codificadas por diferentes cepas de *A. baumannii*. Las secuencias de aminoácidos codificadas por el genoma de *A. baumannii* AB307, correspondientes a los polipéptidos identificados mediante la presente invención (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16)

se compararon con otros 13 genomas secuenciados. En el caso del antígeno AB031, únicamente se usó el bucle extracelular L1 para la comparación.

Tabla 2

Conservación de identidad de aminoácidos por diversas cepas de *A. baumannii*

Diana	AB307	AB056	AB057	AB058	AB059	SDF	AYE	ATCC 17978	ATCC 19606	ACICU	AB900	6013113	6013150	6014059
AB023	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	99%	99%	100%	99%	100%	99%	100%
AB024	100%	100%	100%	100%	100%	86%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	100%	99%
AB025	100%	100%	100%	100%	100%	90%	100%	93%	91%	91%	88%	100%	100%	91%
AB030	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	100%	99%
AB031 L1*	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	100%	100%	100%
FimA	100%	100%	100%	100%	100%	-	100%	74%	100%	100%	94%	100%	100%	100%
CsuAB	100%	100%	100%	100%	100%	-	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
OmpA	100%	100%	100%	100%	100%	89%	100%	93%	94%	93%	93%	99%	99%	93%

* bucle comparado únicamente
 - ningún homólogo detectado

El alto grado de identidad de aminoácidos de las proteínas en diversas cepas de *A. baumannii* muestra la amplia especificidad de las proteínas antigénicas y confirma su alto valor terapéutico. La alta prevalencia de los genes indica que la proteína es importante, posiblemente esencial, durante el ciclo de vida de las bacterias. Por lo tanto, probablemente la proteína se expresa durante la infección. El alto grado de conservación apunta a incrementos en la probabilidad de inducir una respuesta inmunitaria o de identificar un anticuerpo policlonal o monoclonal que se puede unir a la mayoría de o posiblemente a todas las cepas de *A. baumannii* clínicamente pertinentes. Adicionalmente, el alto grado de conservación de aminoácidos indica que las mutaciones de estos genes son infrecuentes, lo que reduce de esta manera las probabilidades de rescatar mutantes durante el tratamiento terapéutico.

La presente invención proporciona una composición de vacuna como se define en el presente documento en la que dicha composición de vacuna comprende adicionalmente un adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "adyuvante" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia distinta del antígeno diana que puede incrementar la respuesta antigénica. El adyuvante se puede seleccionar de adyuvantes de Freund (completo e incompleto), adyuvante de Gerbu (GERBU Biotechnik GmbH, Alemania), micobacterias, tales como BCG, *M. vaccae* o *Corynebacterium parvum*, toxina colérica o toxoide tetánico, toxina termolábil de *E. coli*, mezclas de quil-saponina, tales como QS-21 (SmithKline Beecham), MF59 (Chiron) y diversas emulsiones aceite/agua (por ejemplo, IDEC-AF), MALP-2, ISCOM. Otros adyuvantes que se pueden usar incluyen, pero no están limitados a: sales minerales o geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio; tensioactivos, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, hemocianinas de lapa californiana y dinitrofenol, moléculas inmunoestimuladoras, tales como saponinas, derivados de tripéptidos y muramil dipéptidos, tramos cortos de ácido nucleico, tales como dinucleótidos CpG, oligonucleótidos CpG, monofosforil lípido A, y polifosfacenos, adyuvantes particulados y microparticulados, tales como emulsiones, liposomas, virosomas, partículas similares a virus, cocleatos, o adyuvantes de complejos inmunoestimulantes. Las citocinas también son útiles debido a sus propiedades estimuladoras de linfocitos. Muchas citocinas útiles para dichos propósitos serán conocidas por un experto en la técnica, incluyendo interleucina 2 (IL-2), IL-12, GM-CSF y muchas otras. Además, son adecuados ligandos de la familia de las quimiocinas, tales como RANTES, una lipoproteína, un lipopéptido, un componente de la pared celular de levaduras, un ARN bicatenario, un lipopolisacárido (LPS) de la superficie celular bacteriana, flagelina, un ARN vírico monocatenario rico en U, un ARN interferente pequeño supresor de la señalización de citocinas (ARNip SOCS), un epítipo Pan DR (PADRE) y mezclas de los mismos.

La definición de "excipiente farmacéuticamente aceptable" pretende englobar cualquier excipiente que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el huésped al que se administra.

Por consiguiente, se pueden usar uno o más polipéptidos de la invención o fragmentos, análogos y derivados funcionales de los mismos para preparar una vacuna profiláctica o terapéutica para su administración a una persona

que la necesita. Dicha vacuna que contiene uno o más polipéptidos de la presente invención, como ingrediente activo miembro o principal, se puede administrar en una amplia variedad de formas de dosificación terapéuticas/profilácticas en los vehículos convencionales para administración tópica, mucosal (nasal, oral), sistémica, local y parenteral. De esta manera, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden una solución de un polipéptido de acuerdo con la invención opcionalmente en combinación con un adyuvante adecuado y/o vehículos de administración equivalentes disueltos o suspendidos en un excipiente aceptable, preferentemente un excipiente acuoso. Se puede usar una variedad de excipientes acuosos, por ejemplo, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o se pueden filtrar de manera estéril. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso tal cual, o liofilizar, estando combinada la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponadores y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, entre muchas otras. Los procedimientos actuales para preparar compuestos administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy ("Remington's Pharmaceutical Sciences") Gennaro AR ed. 20.º edición, 2000: Williams & Wilkins PA, EE. UU.

La vía y pauta posológica variarán dependiendo de la fase o gravedad de la afección que se va a tratar, y se ha de determinar por el facultativo experto. Por ejemplo, el(los) polipéptido(s) de acuerdo con la invención y las composiciones que lo contienen se pueden usar para preparar una composición farmacéutica que se puede administrar de forma subcutánea, intradérmica, o tópica o mucosal o intramuscular. Todas estas formas son bien conocidos por los expertos en las técnicas farmacéuticas.

De forma ventajosa, las formulaciones adecuadas de la presente invención se pueden administrar, por ejemplo, en una única dosis, que se puede repetir diariamente, semanalmente o mensualmente.

Las dosis iniciales se pueden seguir de dosis de refuerzo, tras los protocolos de inmunización estándar en la técnica. El efecto inmunoestimulador de las composiciones y procedimientos de la presente invención se puede incrementar adicionalmente combinando cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente, incluyendo su combinación con los vehículos de administración y/o con un compuesto que potencia la respuesta inmunitaria. Los compuestos que potencian la respuesta inmunitaria se clasifican bien como adyuvantes o citocinas. Los adyuvantes pueden potenciar la respuesta inmunológica proporcionando un depósito de antígeno (extracelularmente o en macrófagos), activar macrófagos y estimular conjuntos específicos de linfocitos.

Cada uno de los polipéptidos de la invención se puede conjugar a un vehículo de administración proteínico o no proteínico. Los ejemplos de dichas conjugaciones se describen en Szaóo R. *et al.*, (Biochim Biophys Acta. 2010 dec; 1798(12):2209-16. Epub 2010 Jul 24.) y en "Conjugation of haptens" (Lemus & Karol, Methods Mol Med. 138:167-82, 2008). Es preferente que el propio vehículo de administración tenga un efecto inmunitario, lo que quiere decir que el propio vehículo de administración es inmunógeno.

El vehículo de administración se selecciona del grupo que consiste en péptidos inmunógenos, secuencias de ácidos nucleicos de inmunoestimulación, como las islas CPG, hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide tetánico (TT), subunidad B de la toxina colérica (CTB), bacterias o fantasmas bacterianos, liposoma, quitosoma, virosomas, microesferas, células dendríticas, partículas similares a virus o similares.

En otro modo de realización, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende adicionalmente un vehículo de administración como se define anteriormente en el presente documento. Preferentemente, el vehículo de administración es un virosoma.

Los polipéptidos antigénicos, composiciones o formulación de los mismos de acuerdo con la presente invención se pueden administrar por medio de los vehículos de administración definidos anteriormente en el presente documento, preferentemente mediante un virosoma.

Las composiciones profilácticas o terapéuticas de la presente invención son para su administración en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Dichas preparaciones pueden contener de manera rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sales, agentes tamponadores, conservantes, excipientes compatibles, agentes potenciadores de inmunidad complementarios, tales como adyuvantes y citocinas y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Las preparaciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz es la cantidad de una preparación farmacéutica que sola, o junto con dosis adicionales, estimula la respuesta deseada. En general, se consideran eficaces las dosis de inmunógenos que oscilan desde 0,01 µg/kilogramo a 500 µg/kilogramo de peso corporal, dependiendo del modo de administración. Se cree que el intervalo preferente está entre 0,1 µg/kilogramo y 10 µg/kilogramo de peso corporal. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores, incluyendo la composición seleccionada para su administración, bien si la administración está en una única o en múltiples dosis, y los parámetros del paciente individual, incluyendo la edad, condición física, tamaño, peso, y la fase

de la enfermedad. Estos factores son bien conocidos por el experto en la técnica y se pueden abordar sin más que la experimentación rutinaria.

La pauta de dosificación que utiliza las composiciones de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, incluyendo, por ejemplo, especie, edad, peso, y el estado clínico del paciente, la fase y gravedad de la afección que se va a tratar, y el compuesto particular de la empleado. Un médico experto fácilmente puede determinar y recetar la cantidad eficaz de la vacuna requerida para prevenir, contrarrestar o detener el avance de una enfermedad infecciosa. La precisión óptima en el logro de una concentración de un fármaco con el intervalo que aporta eficacia bien sin toxicidad o con toxicidad aceptable requiere una pauta basada en la cinética de la disponibilidad del fármaco en los sitios diana. Este procedimiento implica una consideración de la distribución, equilibrio y eliminación del fármaco, y está dentro de la capacidad del facultativo experto.

En los usos de la presente invención, los compuestos descritos en detalle en el presente documento pueden formar el ingrediente activo y se administran típicamente en mezcla con excipientes o diluyentes farmacéuticos adecuados seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración pretendida, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes, y similares, y consistentes con las prácticas farmacéuticas convencionales. Por ejemplo, para la administración en forma de un comprimido o cápsula, el componente de vacuna activo se puede combinar con un excipiente inerte farmacéuticamente aceptable no tóxico, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados a la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen, sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen, sin limitación, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Para la administración parenteral, se desean soluciones y suspensiones estériles. Se emplean preparaciones isotónicas que, en general, contienen conservantes adecuados cuando se desea la administración intravenosa. Las preparaciones intraesofágicas que contienen el componente de fármaco activo se pueden mezclar con una variedad de materiales excipientes bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, alcoholes, gel de aloe vera, alantoína, glicerina, aceites con vitaminas A o E, aceite mineral, PPG2 propionato de miristilo, y similares, para formar, por ejemplo, soluciones alcohólicas, limpiadores tópicos, cremas limpiadoras, geles, espumas y lociones, formulaciones en crema o gel especialmente adecuadas para aplicaciones mucosales.

Los polipéptidos antigénicos, composiciones o formulación de los mismos de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles en el logro de una liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(épsilon-caprolactona), poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

En el caso del polipéptido de acuerdo con la invención, se usa para preparar una composición farmacéutica para tratar una enfermedad infecciosa, tal como una infección provocada por *A. baumannii*, la respuesta deseada es el control de la infección y/o eliminación del polipéptido antigénico del sistema. En el caso de la profilaxis, la respuesta deseada es la inmunidad protectora a dicho polipéptido, medida por las respuestas inmunitarias tras la exposición al polipéptido antigénico. Estas respuestas deseadas se pueden comprobar mediante procedimientos de diagnóstico, tales como ELISA, inmunotransferencia y similares [Raem AM. Immunoassay. 2007. P. Rauch [ed.] Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH].

La presente divulgación proporciona un polipéptido antigénico que consiste en una secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16; o fragmento, análogo o derivado funcional del mismo, en el que dicho fragmento, análogo o derivado funcional tiene actividad inmunoestimuladora. Dichos polipéptidos antigénicos, fragmentos, análogos y derivados funcionales de los mismos se definen en más detalle anteriormente en el presente documento.

El polipéptido antigénico que consiste en una secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 14 y 16 que puede comprender hasta 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, preferentemente hasta 5, más preferentemente hasta 3 aminoácidos adicionales; o fragmento, análogo o derivado funcional del mismo, en el que dicho polipéptido antigénico, fragmento, análogo o derivado funcional del mismo tiene actividad inmunoestimuladora.

Se puede hacer referencia a los aminoácidos y residuos de aminoácidos descritos en el presente documento de acuerdo con el código de una o tres letras aceptado al que se hace referencia en libros de texto bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como Stryer, Biochemistry, 4.º ed., Freeman and Co., New York, 1995 and Creighton, Proteins, 2nd Ed. Freeman and Co., New York, 1993.

Como se usa en el presente documento, los términos "péptido" y "polipéptido" se usan como sinónimos y en su sentido más amplio se refieren a una molécula de dos o más residuos de aminoácidos, o análogos de aminoácido. Los

residuos de aminoácidos se pueden unir mediante enlaces peptídicos, o, de forma alternativa, mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" o "residuo de aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo tanto las formas enantiómeras D o L, y análogos de aminoácido.

Las proteínas de superficie bacteriana desempeñan un papel fundamental en la interacción entre la célula bacteriana y su entorno. Están implicadas en la adhesión a e invasión de células huésped, en la detección de las condiciones químicas y físicas del medio externo y el envío de señales apropiadas al compartimento citoplásmico, en la acumulación de defensas frente a las respuestas del huésped y en la toxicidad. Por ende, las proteínas de superficie son potenciales dianas de fármacos destinados a prevenir enfermedades e infecciones bacterianas. Además, a causa de que es probable que las proteínas de superficie interactúen con el sistema inmunitario huésped, se pueden convertir en componentes de vacunas eficaces. Las vacunas basadas en proteínas expuestas en la superficie y secretadas ya están disponibles comercialmente para diversas enfermedades infecciosas; sin embargo, aún no se ha desarrollado una vacuna frente a infecciones por *Acinetobacter* debido a una carencia de disponibilidad de dianas viables.

A pesar de la pertinencia biológica de las proteínas de superficie bacteriana, su caracterización todavía es incompleta. Esto se debe mayoritariamente a las dificultades para definir la topología y composición de proteínas en la superficie bacteriana.

Para identificar los nuevos candidatos de vacuna y dianas para anticuerpos, se usaron tres procedimientos diferentes. Cada uno seleccionado para requisitos particulares para una vacuna y candidato de diana para anticuerpos.

El primer procedimiento, "análisis Shedome", usa enzimas proteolíticas para "desprender" la superficie bacteriana. Los péptidos generados se separan de las células completas, se identifican mediante espectroscopía de masas y posteriormente se asignan a proteínas usando bases de datos disponibles públicamente (Rodríguez-Ortega MJ *et al.*, Nature Biotechnology, 24, 191-197, 2006).

Para discriminar los contaminantes, tales como las proteínas intracelulares, de las proteínas altamente abundantes, como proteínas ribosómicas, y supuestas dianas de membrana, las proteínas identificadas se analizaron para determinar su localización en las bacterias usando herramientas en línea disponibles públicamente. (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuigramn/sosuigramn_submit.html como se publica en K. Imal *et al.*, Bioinformatics 2(9), 417-421 (2008)). Las proteínas que se asignaron como proteína de membrana externa o extracelular se seleccionaron para un análisis adicional. Además, también se seleccionaron las proteínas que se anotaron por la base de datos de UniProtKB como un homólogo de proteínas de membrana externa o extracelulares conocidas.

El concepto del segundo procedimiento, "proteómica comparativa" es centrarse en dianas cuya expresión se confirma experimentalmente en diversas cepas de *Acinetobacter*. La proteómica, el estudio del proteoma, se ha puesto mayormente en práctica a través de la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional en gel. En la primera dimensión, las proteínas se separan mediante isoelectroenfoque, que redisuelve las proteínas en base a la carga. En la segunda dimensión, las proteínas se separan según el peso molecular usando SDS-PAGE. El gel se tiñe con azul brillante de Coomassie o plata para visualizar las proteínas. Los puntos sobre el gel son proteínas que han migrado a localizaciones específicas.

El espectrómetro de masas ha aumentado la proteómica. La huella de masas peptídicas identifica una proteína por escisión en péptidos cortos y, a continuación, deduce la identidad de la proteína emparejando las masas peptídicas observadas frente a una base de datos de secuencias.

De acuerdo con la invención, se determinó el proteoma completo de la preparación de proteínas enriquecida en proteínas de membrana externa mediante espectrometría de masas de cinco cepas de *A. baumannii* diferentes. Se seleccionaron las cinco cepas de *A. baumannii* ATCC19606, BMBF65, SDF, ACICU, AYE debido a sus diferentes fuentes de aislamiento. ATCC19606 es una vieja cepa aislada de *A. baumannii* de 1948 (Hugh R., Reese R., Int. J. Syst. Bacteriol. 17: 245-254, 1967) usada por muchos laboratorios de investigación como una cepa de referencia. AYE es una cepa de *A. baumannii* que fue epidémica en Francia durante 2001 (Vallenet *et al.*, PLoS One 3:E1805-E1805(2008)). ACICU se aisló durante un brote epidémico en Roma, Italia, 2005 (Iacono M., *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 52:2616-2625(2008)). BMBF-65 se aisló a partir de un paciente en Singapur en 2004. SDF es la única cepa aislada no clínica de *A. baumannii* que se aisló a partir de piojos del cuerpo recogidos en 1997 en Marsella, Francia (Vallenet *et al.*, PLoS One 3:E1805-E1805(2008)).

Para enriquecer las supuestas dianas que están presentes en la superficie extracelular, las preparaciones de proteínas se enriquecieron en proteínas de membrana externa antes del análisis por EM de acuerdo con sus propiedades hidrófilas e hidrófobas. Los péptidos identificados mediante espectroscopía de masas se asignaron a proteínas usando bases de datos disponibles públicamente y se seleccionaron de acuerdo con predicciones de TI y búsquedas bibliográficas.

- El tercer enfoque se refiere a la identificación de dianas que se reconocen por anticuerpos presentes en sueros de pacientes con *A. baumannii* convalecientes. Por consiguiente, las preparaciones de proteínas enriquecidas para proteínas de membrana externa (ME) se separaron mediante electroforesis bidimensional en gel (2DE). La 2DE estaba constituida de un isoelectroenfoque (IEE) seguido de una etapa de SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para redissolver las proteínas ME. Se determinaron las proteínas reconocidas por los sueros de pacientes mediante análisis de inmunotransferencia. Para incrementar las probabilidades de identificar las proteínas que se expresan por diversas cepas diferentes, se compararon las inmunotransferencias de al menos dos cepas de *A. baumannii* y las proteínas presentes en todas las cepas analizadas se seleccionaron para la identificación de proteínas mediante análisis por EM. Las proteínas se caracterizaron individualmente y se seleccionaron de acuerdo con predicciones de TI y búsquedas bibliográficas. Las proteínas que se identificaron como proteína de *A. baumannii* y se predijo que eran o se anotaron como una proteína de membrana externa se eligieron como supuestas dianas. En caso de que la técnica anterior hubiera predicho que los homólogos de dichas dianas estaban regulados por disminución o ausentes en cepas de *A. baumannii* resistentes a antibióticos, estos objetivos se excluyeron de un análisis adicional.
- De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona al menos un polipéptido identificado mediante los enfoques de acuerdo con la invención.
- En un modo de realización preferente de la invención, dicho polipéptido se asocia con la patogenia infecciosa de un organismo, preferentemente de *A. baumannii*, de acuerdo con cualquier modo de realización o aspecto previo de la invención.
- Más preferentemente, dicho polipéptido es al menos uno de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 o fragmento, análogo o derivado funcional del mismo.
- Las dianas que se seleccionaron para el desarrollo de vacunas cumplen al menos dos de los siguientes tres requisitos:
1. Las dianas son accesibles a moléculas grandes (enfoque 1: proteínas de superficie identificadas mediante análisis Shedome).
 2. Las dianas se expresan por muchas cepas de *A. baumannii*, preferentemente por cepas que representan importantes cepas aisladas clínicas (enfoque 2: proteómica comparativa).
 3. Las dianas inducen una respuesta inmunitaria y se expresan en pacientes durante la infección (enfoque 3: identificación de dianas específicas).
- Los números de dianas potenciales que satisfacen los requisitos de cada etapa de selección se especifican en la tabla 3. Las dianas potenciales seleccionadas mediante este procedimiento se designan en la fila final.
- La tabla 3 a continuación muestra el procedimiento de selección para la identificación de dianas mediante diferentes enfoques. Cada enfoque se centra en un requisito particular descrito anteriormente. Los números en negrita indican el número de proteínas que satisfacen los requisitos de la etapa de selección correspondiente. Los detalles del procedimiento de selección se dan en el ejemplo 1.2.

Tabla 3

	Análisis Shedome	Proteómica comparativa	Identificación de dianas específicas
Números totales de dianas potenciales	> 3500 <i>genes anotados en genomas de A. baumannii</i>		
Selección experimental	Determinación del proteoma de hidrolizado tripsínico de <i>A. baumannii</i> viva 163	Determinación del proteoma de preparaciones de membrana externa de 5 cepas de <i>A. baumannii</i> diferentes 1552	Comparación de 2DE inmunotransferencias de preparaciones de membrana externa de 2 cepas de <i>A. baumannii</i> diferentes usando sueros de pacientes. 7
1.º selección <i>in silico</i> Proteínas identificadas por 5 cepas	N/A	363	N/A
2.º selección <i>in silico</i> Predicción de TI: - Proteínas extracelulares - Proteínas de membrana externa con epítomos localizados en la superficie.	7	30	5
Números totales de dianas potenciales	> 3500 <i>genes anotados en genomas de A. baumannii</i>		
3.º selección <i>in silico</i> Si están disponibles, datos de la bibliografía	3	6	4
predicción de TI: -alta prevalencia de genes -alta conservación de secuencias de aminoácidos			
Dianas seleccionadas	FimA, CsuAB, OmpA	AB023, AB024, AB025, AB030, AB031, OmpA	AB023, AB024, AB025, OmpA

5 Se realizó la predicción de TI como sigue: se realizó la detección de homología entre proteínas y la predicción de estructuras mediante comparación HMM-HMM usando la herramienta informática en línea HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>), Söding J., p.951-960, (2005) usando la base de datos HMM pdb70_3Sep11, HHblits como procedimiento de generación MSA con 3 iteraciones como máximo y Modo de alineamiento local.

10 La tabla 4 muestra los homólogos estructurales de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 como se determina mediante análisis del banco de datos.

Tabla 4

Antígeno SEQ ID NO:	ID de proteína 1	Consulta HMM ²	Plantilla HMM ²	Probabilidad ³ [%]	Valor de E ⁴	Valor de P ⁵	Descripción de la plantilla ¹
AB023 SEQ ID NO: 2	2wjr 2o4v	346-417 52-417	29-95 32-411	93,0 92,4	0,25 6,6	9,9E-06 0,00026	NanC-Porin (<i>E.coli</i>) OprP-Porin (<i>P. aeruginosa</i>)
AB024 SEQ ID NO: 4	2zfg 2fgq	97-435 100-435	7-340 3-332	99,7 99,5	4E-12 9E-11	1,6E-16 3,5E-15	OmpF-Porin (<i>E. coli</i>) Omp32-Porin (<i>D. acidovorans</i>)
AB025 SEQ ID NO: 6	2o4v 2qtk	116-439 144-474	60-411 88-389	96,3 90,4	0,79 14	3,1E-05 0,00054	OprP-Porin (<i>P. aeruginosa</i>) Opdk-Porin (<i>P. aeruginosa</i>)
AB030 SEQ ID NO: 8	2qdz 3efc	269-906 241-543	10-554 79-375	100,0 100,0	1,4E-45 2,5E-31	0 9,9E-36	FahC-Omp85 (<i>P. pertussis</i>) YaeT- Omp85 (<i>E.coli</i>)
AB031 SEQ ID NO: 10	1ek9 1yc9	42-485 42-486	2-409 34-440	100,0 100,0	4,2E-45 1,7E-44	0 0	ToIC-canal (<i>E.coli</i>) Vcec-canal (<i>V.cholerae</i>)
FimA SEQ ID NO: 12	2jmr 2jty	21-177 16-177	2-155 1-159	100,0 99,9	4,2E-30 1,1E-27	1,6E-34 4,3E-32	FimF-tipo I Pili (<i>E.coli</i>) FimA-tipo I Pili (UP- <i>E.coli</i>)
CsuAB SEQ ID NO: 14	3me0 1ze3	40-180 38-180	8-127 1-121	98,3 97,8	1,4E-05 0,000 43	5,6E-10 1,7E-08	PapD-tipo I Pili (<i>E.coli</i>) FimD-tipo I Pili (<i>E.coli</i>)
OmpA SEQ ID NO: 16	3nb3 2kg w	1-345 208-335	1-344 1-128	100,0 100,0	0 1,6E-28	0 6,2E-33	OmpA-(<i>E.coli</i>) Ompatb-(<i>M.tuberculosis</i>)

1: ID de proteína de homólogo estructural (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Wang Y, *et al.*, Nucleic Acid Res. 2007 Jan; 35 (ejemplar de base de datos): D298-300.) que incluye una breve descripción (nombre, función, especie) en la última columna.

2: HMM: modelo oculto de Markov. Las secuencias de aminoácidos que producen homología entre la consulta y la plantilla. El número indica las posiciones de la secuencia de aminoácidos en la consulta (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) o plantilla (ID de proteína) que produce homología.

3: Probabilidad: "probabilidad de la plantilla de ser un verdadero positivo".

4: Valor de E: "Valor esperado. El valor de E y el valor de P se calculan sin tener en cuenta la estructura secundaria. El valor de E da el número promedio de falsos positivos ('resultados incorrectos') con una puntuación mejor que la de la plantilla cuando se realiza un barrido de la base de datos. Es una medida de la fiabilidad: los valores de E cercanos a 0 significan un resultado muy fiable, un valor de E de 10 quiere decir que se espera encontrar aproximadamente 10 resultados incorrectos en la base de datos con una puntuación al menos tan buena como esta".

5: Valor de P: "El Valor P es el valor de E dividido por el número de secuencias en la base de datos. Es la probabilidad de que en una comparación por parejas un resultado erróneo puntúe al menos tan bien como este".

Cualquiera de los polipéptidos con SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 tiene actividad inmunoestimuladora.

5 La tabla 5 se refiere a la expresión de los polipéptidos antigénicos de la invención en cepas aisladas clínicas de *A. baumannii*. Se incluyeron en el estudio un total de 36 cepas aisladas clínicas de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, pus y aspirados traqueales de pacientes ingresados en el hospital. Dichas cepas aisladas clínicas (*ejemplo 1.1.4*) se usaron para aislar lisados bacterianos o sobrenadante de cultivo precipitado que se sometieron a prueba después de electroforesis en gel mediante análisis de inmunotransferencia. Para la detección de cada polipéptido antigénico se usó el antisuero de conejo correspondientes (*ejemplo 5*).

10 La tabla 5 muestra los porcentajes y el número real de cepas aisladas clínicas de *A. baumannii* en las que cualquiera de los polipéptidos antigénicos individuales identificados (diana) demostró estar presente o ausente mediante análisis de inmunotransferencia en las preparaciones de sedimentos celulares bacterianos.

15

Tabla 5

Diana	Número de cepas aisladas clínicas	Diana detectada en sedimento celular bacteriano de cepas aisladas clínicas	
		presente	ausente
AB023	20	100% (20)	0%(0)
AB024	20	100% (20)	0% (0)
AB025	21	100% (21)	0% (0)
AB030	21	100% (21)	0% (0)
AB031	24	100% (24)	0% (0)
FimA	36	44% (16)	56% (20)
CsuAB*	36	81% (29)	19% (7)
OmpA	32	100% (32)	0% (0)

* Los niveles de expresión de csuAB variaron entre diferentes cepas. Un 19 % no mostró expresión, un 24 % débil y un 62 % media a fuerte.

- 5 La figura 2 muestra los polipéptidos de la invención que tienen actividad inmunoestimuladora. Los conejos se inmunizaron con los polipéptidos. Los sueros de estos conejos demostraron ser positivos para anticuerpos específicos para polipéptidos.
- 10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica dicho(s) polipéptido(s) antigénico(s).
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Además, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende dicho vector.
- 15 Existe una cantidad significativa de bibliografía publicada con respecto a la construcción del vector de expresión y producción y purificación de polipéptidos expresados de manera recombinante (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY y referencias en el mismo; DNA Cloning: F M Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).
- 20 Adicionalmente, la presente invención proporciona células huésped que comprenden el vector y/o el ácido nucleico adecuado para la expresión del vector. En la técnica, se conocen numerosos sistemas de expresión procariontes y eucariotes en los que son preferentes células huésped eucariotas, tales como células de levaduras, células de insectos, células vegetales y células de mamífero, tales como células HEK293, células PerC6, células CHO, células COS o células HELA y derivados de las mismas. Son particularmente preferentes las líneas celulares de producción humana. Es preferente que las células huésped transfectadas secreten el anticuerpo producido en el medio de cultivo.
- 25 Si se logra expresión intracelular se logra, a continuación, se realiza la renaturalización de acuerdo con procedimientos estándar, tal como se describe por Benetti P.H. *et al.*, Protein Expr. Purif. 13(3):283-290 (1998).
- 30 La producción de los polipéptidos de acuerdo con cualquier modo de realización o aspecto previo de la invención comprende: (i) proporcionar una célula transformada/transfectada con un vector de acuerdo con la invención; (ii) cultivar dicha célula en condiciones propicias para la fabricación de dichos polipéptidos; y (iii) purificar dicho polipéptido a partir de dicha célula, o su entorno de crecimiento.
- 35 En un modo de realización preferente de la invención, dicha célula es una célula procarionte.
- De forma alternativa, dicha célula es una célula eucariota seleccionada de: fúngica, de levadura, de insecto, de algas, de mamífero, vegetal.
- 40 La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que une específicamente el polipéptido como se define anteriormente, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede neutralizar *Acinetobacter baumannii*.
- 45 El término "fragmento de unión a antígeno" quiere decir cualquier fragmento del anticuerpo que se puede unir a cualquier polipéptido definido por las reivindicaciones. El fragmento tiene una longitud de al menos 10, preferentemente 20, más preferentemente 50 aminoácidos. Es preferente que el fragmento comprenda la región de

unión del anticuerpo. Es preferente que el fragmento sea un fragmento Fab o F(ab')₂ o una mezcla de los mismos.

Una "función efectora" mediada por anticuerpos puede ser la inhibición de una función específica del antígeno diana, tal como la neutralización de un efecto de una toxina bacteriana secretada, previniendo así los efectos perjudiciales de la toxina sobre las interacciones entre proteínas, función enzimática, funciones celulares, integridad celular, estructuras tisulares y otros procesos biológicos. Otra función efectora mediada por anticuerpos puede ser la inactivación de la función de una proteína bacteriana específica, tal como una porina y otras proteínas o estructuras sobre la superficie celular, afectando así al ciclo de vida bacteriano normal. Otra función efectora mediada por anticuerpos puede consistir en la activación de procesos inmunológicos, tales como la activación de la cascada del complemento, inducción de la producción de citocinas y quimiocinas, activación de componentes celulares del sistema inmunitario y otras reacciones inmunológicas que conducen a la destrucción y retirada de células bacterianas.

En un modo de realización preferente de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal o uno monoclonal, en el que dichos anticuerpos son específicos para dicho polipéptido.

A fin de producir anticuerpos policlonales en un huésped, tal como un ratón o conejo, se inmuniza el huésped con el polipéptido antigénico o fragmento o análogo o derivado funcional del mismo, opcionalmente con un adyuvante. Posteriormente, se recogen los anticuerpos para el polipéptido antigénico a partir de los sueros del huésped. El anticuerpo policlonal se puede purificar por afinidad frente al antígeno volviéndose específico. Dichas preparaciones de anticuerpos policlonales también pueden derivar de donantes humanos, bien vacunados, convalecientes o donantes sanos normales, mediante fraccionamiento plasmático para generar fracciones de inmunoglobulina policlonal y se pueden enriquecer adicionalmente frente al antígeno volviéndose específico.

Dichos anticuerpos policlonales se obtuvieron inmunizando conejos con los polipéptidos antigénicos AB023, AB024, AB025, AB030, AB031L, ABFimA, ABCsuAB and AB0mpA. De cuatro a ocho semanas después de la inmunización se recogieron muestras de sangre y sueros sometidos a prueba para determinar la presencia de anticuerpos específicos para polipéptidos; véanse las figuras 3 y 4.

Los anticuerpos policlonales reconocen muchos epítomos diferentes. En cambio, los anticuerpos monoclonales son específicos para un único epítomo. Los detalles adicionales con respecto a la estructura de anticuerpos y sus diversas funciones se pueden encontrar en "Using Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1999.

En un modo de realización preferente adicional, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que puede inducir una función efectora hacia *Acinetobacter baumannii*. Lo más preferentemente, el anticuerpo monoclonal de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo une específicamente el motivo de consenso de epítomo PVDFTVAI mostrado en SEQ ID NO: 36.

El término "epítomo" incluye cualquier determinante, preferentemente un determinante polipeptídico, que se pueda unir específicamente a una inmunoglobulina. En determinados modos de realización, los determinantes epítomos incluyen agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o grupos sulfonilo, y, en determinados modos de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítomo es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales normalmente se unen a estos motivos de consenso, que mayoritariamente son de 5 aminoácidos de longitud, o 6, 7 u 8 aminoácidos de longitud. En un modo de realización preferente, el anticuerpo proporcionado por la invención es monoclonal y se une específicamente a un motivo de consenso de epítomo de 8 aminoácidos de longitud. En determinados modos de realización, se afirma que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de manera preferencial su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En modos de realización preferentes, se afirma que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es menos de o igual a aproximadamente 10 nM, más preferentemente cuando la constante de disociación es menos de o igual a aproximadamente 100 pM, y lo más preferentemente cuando la constante de disociación es menos de o igual a aproximadamente 10 pM.

En un modo de realización adicional, el anticuerpo de la invención es humano. El término "humano" como se usa en el presente documento, engloba cualquier anticuerpo parcial o totalmente humano independiente de la fuente de la que se obtiene el anticuerpo. Es preferente la producción de un anticuerpo monoclonal humano mediante un híbridoma. Por ejemplo, se puede obtener el anticuerpo monoclonal humano que consiste en secuencias de aminoácidos humanas a partir de un híbridoma en el que el linfocito B es un linfocito B humano. También se puede obtener el anticuerpo monoclonal mediante ingeniería genética.

También se contemplan anticuerpos "humanizados", como son anticuerpos quiméricos de ratón, rata u otras especies que presentan dominios de regiones variables y/o constantes humanos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos recombinantes y genomanipulados y fragmentos de los mismos. Las técnicas de "humanización" implican típicamente el uso de tecnología de ADN recombinante para manipular las secuencias de ADN que codifican las cadenas polipeptídicas de la molécula de anticuerpo. Los procedimientos incipientes para humanizar anticuerpos monoclonales (MAb) implicaban la producción de anticuerpos quiméricos en los que un sitio de unión a antígeno que comprendía los

dominios variables completos de un anticuerpo se enlaza a dominios constantes derivados de otro anticuerpo. Los procedimientos para llevar a cabo dichos procedimientos de quimerización se describen en los documentos EP0120694 (Celltech Limited), EP0125023 (Genentech Inc. y City of Hope), EP-A-0 171496 (Rev. Dev. Corp. Japan), EP-A-0 173 494 (Stanford University), y el documento WO 86/01 533 (Celltech Limited). En general, estas aplicaciones divulgan procedimientos para preparar una molécula de anticuerpo que tiene los dominios variables de un MAb de ratón y los dominios constantes de una inmunoglobulina humana. Se describen enfoques alternativos en el documento EP-A 023 9400 (Winter), en que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un MAb de ratón se han injertado en las regiones estructurales de los dominios variables de una inmunoglobulina humana mediante mutagénesis dirigida a sitio usando oligonucleótidos largos. Véase la pat. de EE. UU. n.º 7.262.050 para un ejemplo de dichos procedimientos.

También se pueden obtener anticuerpos humanizados a partir de animales transgénicos. Por ejemplo, se han descrito ratones mutantes transgénicos que pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos, en respuesta a la inmunización, (véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Brüggemann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993)). Específicamente, la delección homocigótica del gen de la región de unión (J(H)) de cadena pesada del anticuerpo en estos anticuerpos quiméricos y ratones mutantes de línea germinal da como resultado la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos, y la transferencia satisfactoria de la micromatriz genética de anticuerpo de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos frente a la exposición a antígenos.

La secuencia de aminoácidos humana del anticuerpo monoclonal humano previene la aparición de efectos adversos no deseados, tales como reacciones de rechazo o choque anafiláctico.

De acuerdo con un modo de realización preferente adicional, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención se modifica de manera N terminal, interna y/o C terminal. La modificación se selecciona de al menos una de di, oligo o polimerización de la forma monomérica, por ejemplo, mediante reticulación usando dicitclohexilcarbodiimida. Los di, oligo o polímeros producidos de esta manera se pueden separados entre sí mediante filtración en gel. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones de cadenas laterales, por ejemplo, modificaciones de residuos de ϵ -amino-lisina, o modificaciones amino y carboxiterminales, respectivamente. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glucosilación y/o desglucosilación parcial o completa de la proteína, y formación de enlaces disulfuro. El anticuerpo también se puede conjugar a un marcador, tal como un marcador enzimático, fluorescente o radioactivo.

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención se produce a partir de un linfocito B humano o un hibridoma obtenido por fusión de dicho linfocito B humano con una célula de mieloma o heteromieloma.

La presente invención proporciona adicionalmente un hibridoma que puede producir un anticuerpo monoclonal. Se conoce bien en la técnica la producción de anticuerpos monoclonales usando células de hibridoma. Los procedimientos usados para producir anticuerpos monoclonales se divulgan por Kohler y Milstein en Nature 256, 495-497 (1975) y también por Donillard y Hoffman, "Basic Facts about Hybridomas" en Compendium of Immunology V. ed. por Schwartz, 1981.

De forma alternativa a la tecnología de hibridoma, también se puede obtener el anticuerpo monoclonal humano por expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y pesada del anticuerpo. Por consiguiente, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y pesada del anticuerpo, un vector que comprende dichos anticuerpos y una célula huésped que comprende dicho vector y/o dichos ácidos nucleicos.

Preferentemente, un vector de acuerdo con la invención se selecciona de adenovirus, virus variolovacunal, baculovirus, virus SV 40, retrovirus, virus de plantas o bacteriófagos, tales como derivados lambda o M13, comprende al menos un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y al menos un ácido nucleico que codifican la cadena pesada. Una célula huésped transformada con dicho vector y cultivada en condiciones adecuadas para la expresión recombinante de la cadena de anticuerpo codificada puede ensamblar el anticuerpo monoclonal humano de tal manera que se genera una estructura tridimensional que es equivalente a la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal humano producido por un linfocito B humano. Si se produce la cadena ligera por separado a partir de la cadena pesada, a continuación ambas cadenas se pueden purificar y posteriormente ensamblar para producir un anticuerpo monoclonal humano que tenga esencialmente la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal humano producido por un linfocito B humano.

Además, se proporciona un procedimiento para producir el anticuerpo como se define anteriormente que comprende cultivar un hibridoma en condiciones que permitan la secreción de un anticuerpo, y opcionalmente purificar el anticuerpo del sobrenadante de cultivo.

Además, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido antigénico como se define anteriormente o el anticuerpo como se define anteriormente.

La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente ingredientes farmacéuticamente aceptables

conocidos en la técnica.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se aplican para el tratamiento de enfermedades provocadas por *A. baumannii* en infecciones, tales como septicemia, neumonía, bronquitis crónica, infecciones locales que incluyen heridas infectadas e infecciones invasivas de articulaciones, principalmente en pacientes inmunodeficientes y/o en pacientes con función respiratoria deteriorada. Las composiciones farmacéuticas están destinadas adicionalmente, pero no limitadas a, la profilaxis y/o tratamiento de infecciones adquiridas en el hospital (nosocomiales). Puesto que las principales víctimas de infecciones por *A. baumannii* son pacientes intubados, víctimas con quemaduras, pacientes en unidades de cuidados intensivos médicas y/o quirúrgicas, pacientes con sida y cáncer, pacientes inmunodeficientes, pacientes inmunodeprimidos, pacientes diabéticos, personal militar, personal de lucha armada y personal de soporte asociado, así como toxicómanos por vía intravenosa, las composiciones farmacéuticas están destinadas en particular a la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades provocadas por *A. baumannii* en dicho grupo de pacientes.

La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente fármacos antibióticos.

Las composiciones farmacéuticas comprenden el polipéptido antigénico o el anticuerpo en un intervalo de concentración de 0,1-30 mg/kg de peso corporal.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier manera conocida, tal como administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, tópica, intranasal, o como pulverización de inhalación.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende el polipéptido antigénico o el anticuerpo como se define anteriormente para detectar una infección bacteriana en un paciente. La detección de una infección bacteriana, en particular, una infección bacteriana provocada por *A. baumannii* de acuerdo con la invención, se puede realizar sobre ADN bacteriano aislado, o directamente a partir de muestras clínicas como expectoración, lavado broncoalveolar o aspiración traqueal, normalmente después de la dilución en H₂O ultrapura. Son preferentes muestras obtenidas directamente a partir de un lavado pulmonar de un ser humano, tal como un paciente humano con un trastorno pulmonar. Las muestras clínicas también pueden incluir materiales corporales, tal como sangre, suero sanguíneo, orina, tejidos y similares. Típicamente, las muestras se pueden tomar a partir de herida, quemadura, infecciones urinarias y pulmonares de seres humanos o mamíferos. Los polipéptidos antigénicos de la invención se pueden usar para analizar los anticuerpos en sueros sanguíneos. Los anticuerpos son adecuados para la detección del polipéptido antigénico (dianas), por ejemplo, en una muestra clínica. El alto valor como una herramienta de diagnóstico de los polipéptidos antigénicos o el anticuerpo específico para los mismos se demuestra en la tabla 1 y figura 3.

La presente invención proporciona un anticuerpo policlonal o monoclonal para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana en un mamífero.

Preferentemente, el mamífero es un ser humano. El anticuerpo se usa preferentemente para el tratamiento y/o prevención en el que la infección bacteriana está provocada por *A. baumannii*, lo más preferentemente esta infección es adquirida en el hospital.

Las áreas de enfermedad que en la actualidad aceptan especialmente tratamientos basados en anticuerpos incluyen cáncer, regulación errónea del sistema inmunitario e infección. Dependiendo de la enfermedad y la biología de la diana, los anticuerpos usados para el tratamiento -anticuerpos terapéuticos- pueden tener diferentes mecanismos de acción. Un anticuerpo monoclonal terapéutico se puede unir y neutralizar la función normal de una diana. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que bloquea la actividad de la proteína necesaria para la supervivencia de una célula cancerosa provoca la muerte celular. Otro anticuerpo monoclonal terapéutico se puede unir y activar la función normal de una diana. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal se puede unir a una proteína en una célula y desencadenar una señal de apoptosis. Finalmente, si un anticuerpo monoclonal se une a una diana expresada únicamente en un tejido enfermo, la conjugación de una carga útil tóxica (agente eficaz), tal como un agente radiactivo o quimioterápico, al anticuerpo monoclonal puede crear un proyectil guiado para administración específica de la carga útil tóxica al tejido enfermo, lo que reduce el daño al tejido sano.

Los anticuerpos profilácticos protegen de o previenen la propagación o aparición de la enfermedad o infección

Un anticuerpo definido por su estructura/secuencia potencialmente tiene función profiláctica y terapéutica dependiendo del momento de la administración.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un polipéptido para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana en un mamífero codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

a) un polinucleótido que tiene la secuencia de ácidos nucleicos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15;

b) un polinucleótido que codifica un fragmento, análogo o derivado funcional de un polipéptido codificado por el polinucleótido de (a), en el que dicho fragmento, análogo o derivado funcional tiene actividad inmunoestimuladora;

5 c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y que tiene actividad inmunoestimuladora;

10 d) un polinucleótido que es al menos un 80 % idéntico al polinucleótido de (a), y que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora;

e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d); y

15 f) un polinucleótido que es el complemento de la longitud completa de un polinucleótido de cualquiera de (a) a (d).

Preferentemente, el polipéptido es para su uso en un mamífero. Más preferentemente, el polipéptido es para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana, en la que la infección está provocada por *Acinetobacter baumannii*; más preferentemente el polipéptido antigénico de la invención es para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana, en la que la infección es adquirida en el hospital.

20 La invención se ilustra adicionalmente por referencia a modos de realización específicos descritos en los ejemplos y figuras presentados a continuación.

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1: identificación de dianas (polipéptidos antigénicos)

1.1 Materiales

30 A menos que no se especifique de otro modo, los reactivos químicos definidos fueron de calidad analítica y derivaron de proveedores cualificados, principalmente Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza).

1.1.1 Medios bacterianos

35 El caldo Luria-Bertani (LB) consistió en un 1 % (p/v) de triptona (Fluka/Sigma-Aldrich, Suiza), un 0,5 % (p/v) de extracto de levadura (Fluka), un 1 % (p/v) de NaCl. Inmediatamente después de la preparación, el LB se esterilizó en autoclave (121 °C durante 20 minutos) y se mantuvo estéril a temperatura ambiente durante hasta 3 meses. Por placa de LB-agar (LBA) se añadió un 0,75 % (p/v) de agar (Fluka) a LB antes de que los medios se esterilizaran en autoclave. Luego se distribuyó el LBA caliente en placas de Petri de plástico (Sterilin, Cambridge, Reino Unido) antes de que los medios se enfriaran por debajo de 50 °C. Una vez que solidificó el LBA en las placas de Petri, las placas de LBA se mantuvieron a 4 °C durante hasta 3 meses. Se encargaron placas de BHI-agar a Becton Dickinson (Heidelberg, Alemania).

1.1.2 Cepas bacterianas

45 Se usaron varias cepas bacterianas. Las cepas bacterianas más pertinentes usadas para generar los datos y los procedimientos experimentales se enumeran en la tabla 5. Además, se recibieron varias cepas aisladas clínicas de *A. baumannii* por parte del Prof. Seifert (Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Universidad de Colonia, Alemania), del Prof. Dijkshoorn (Leiden University Medical Centre, Leiden, NL), del Prof. Nordmann, (Centre Hospitalier Universitaire der Bicêtre, Service de Bactériologie-Virologie, Le Kremlin-Bicêtre cedex, Francia).

50

ES 2 568 071 T3

Tabla 6

Cepa	Especie	Referencia	Fuente
ATCC19606	<i>A. baumannii</i>	Hugh R., Reese R. Int. J. Syst. Bacteriol. 17:245-254, 1967	Prof. Luis Actis, Miami University, Department of Microbiology, 40 Pearson Hall Oxford, Ohio 45056
OmpA KO	<i>A. baumannii</i>	Gaddy, J. A. <i>et al.</i> , Infection and Immunity 77 (8), S. 3150-3160. (2009)	
CsuE KO	<i>A. baumannii</i>	Tomares, Microbiology, 154, 3398 (2008)	
AYE	<i>A. baumannii</i>	Vallenet <i>et al.</i> , PLoS	Profs. D. Raoult, M. Drancourt URMITE-CNRS UMR6236, Marsella Francia
SDF	<i>A. baumannii</i>	One 3:E1805-E1805(2008))	
ACICU	<i>A. baumannii</i>	Iacono M., <i>et al.</i> , Antimicrob. Agents Chemother. 52:2616-2625(2008).	Prof. Alessandra Carattoli Department for Infectious, Parasitic and Immune-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma-Italia
Ruh134	<i>A. baumannii</i>	Cepa aislada clínica Rotterdam, NL, 1982	Prof. L. Dijkshoorn, Leiden University Medical Centre, Leiden, NL
Ruh875	<i>A. baumannii</i>	Cepa aislada clínica Dordrecht, NL, 1984	
Berlín-95	<i>A. baumannii</i>	Cepa aislada clínica Berlín, GE, 2006	Prof. Seifert, Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Universidad de Colonia, Alemania
BMBF65	<i>A. baumannii</i>	Cepa aislada clínica Singapur, 2004	
AB-M	<i>A. baumannii</i>	Eveillard, <i>et al.</i> , Journal of Infection 60 (2), 154-161, 2010	
AB-NM	<i>A. baumannii</i>		Prof. Marie-Laure Joly Guillou, UFR Sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé 16, Bd Daviers, 49045, Angers, Francia
SAN	<i>A. baumannii</i>		
PA O11	<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 33358, Liu PV, <i>et al.</i> Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 256-264, 1983	
DH5alfa	<i>E. coli</i>		Invitrogen
BL-21 (DE3)	<i>E. coli</i>		Novagen
NCBI: National Center for Biotechnology Information; ATCC: American Tissue Culture Collection, Virginia, USA1.1.3 Genomas de referencia de <i>A. baumannii</i> .			

5 Se usaron varios genomas publicados para la identificación y caracterización de dianas identificadas, como se resume en la tabla 7.

Tabla 7: Secuencias genómicas

<i>Genoma de A. baumannii</i>	<i>Secuencia de referencia</i>
ATCC19606	¹ NZ_ACQB000000000
AYE	¹ NC_010410
ACICU	¹ NC_010611
SDF	¹ NC_010400
AB307-0294	¹ NC_011595
6014059	¹ NZ_ACYS000000000
6013113	¹ NZ_ACYR000000000
6013150	¹ NZ_ACYQ000000000
AB0057	¹ NC_011586
ATCC 17978	¹ NC_009085
AB059	¹ NZ_ADHB000000000
AB058	¹ NZ_ADHA000000000
AB056	¹ NZ_ADGZ000000000
AB900	¹ NZ_ABXK000000000
¹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome	

1.1.3 Sueros de pacientes

5 Los sueros de paciente se recogieron en diversos hospitales. En estudios previos se describieron sueros de 20 pacientes (Pantophlet, R. *et al.* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7 (2), 293-295, (2000)) y se recibieron por parte del Prof. Seifert (Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Universidad de Colonia, Alemania).

10 Adicionalmente se recogieron 57 sueros de pacientes de hospitales en Atenas (Grecia), Sevilla (España), Pittsburgh (PE, EE. UU.) y Jerusalén (Israel). Se aplicaron los siguientes criterios de inclusión:

1. los pacientes tienen confirmada septicemia por *A. baumannii*, neumonía o herida infectada grave,

15 2. el estado de salud del paciente permite la extracción sanguínea y

3. que el paciente es un adulto de menos de 85 años de edad. Se excluyeron los pacientes con infección vírica confirmada (por ejemplo, hepatitis A, B o C, VIH), anemia o un sistema inmunitario deprimido. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado. Se recogieron sueros de donantes sanos del centro de donación de sangre de la Cruz Roja Suiza en Berna (Suiza).

20 1.2 Enfoques para identificar dianas adecuadas

1.2.1 Análisis "Shedome"

25 El concepto de este procedimiento es identificar polipéptidos en la membrana de *Acinetobacter*, ya que son accesibles a moléculas grandes, tales como anticuerpos. De esta manera, las bacterias *A. baumannii* vivas se desprendieron con tripsina, una proteasa de 23 kDa, y se analizaron mediante espectrometría de masas (EM). Se asignaron los péptidos identificados a proteínas usando bases de datos públicas disponibles. Se puede esperar que, además de contaminantes de proteínas altamente abundantes y bacterias lisadas, el hidrolizado contenga péptidos derivados de

30 proteínas presentes en el lado extracelular de la membrana bacteriana.

1.2.1.1 Preparación de cultivos bacterianos

35 Se sembró en estrías la cepa de *A. baumannii* ATCC19606 en una placa de LBA y se incubó durante la noche (16 h-24 h) a 37 °C. La placa de LBA con colonias bacterianas visibles se mantuvo a 4 °C durante hasta 1 mes. Como cultivo de partida, se inocularon 25 ml de LB usando colonias de *A. baumannii* de la placa de LBA y se incubó durante la noche a 37°C agitando a 200 rotaciones por minuto (rpm). Se midió la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) del cultivo de durante la noche. Se inoculó LB (0,4 l) con cultivo de durante la noche a una DO₆₀₀ de partida de 0,05 y se incubó a

37 °C agitando a 200 rpm durante 3,5 h hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0,68.

1.2.1.2 Hidrolizados tripsínicos de bacterias vivas

5 Rodriguez-Ortega *et al.* (Nature Biotechnology, 24, 191-197, 2006) describieron previamente un procedimiento para hidrolizado tripsínico de bacterias grampositivas, que se usó para establecer el siguiente protocolo para la *A. baumannii* gramnegativa. Las bacterias se centrifugaron a 3500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se lavó el sedimento 3 veces en 40 ml de PBS (un 8 % (p/v) NaCl, un 2 % (p/v) de KCl, un 1,1 % (p/v) de Na₂HPO₄, un 0,2 % (p/v) de KH₂PO₄, pH=7,4) a 4 °C mediante resuspensión y centrifugación. Se lavó el sedimento una vez en 2 ml de tampón sacarosa (PBS que contenía un 40 % (p/v) sacarosa, DTT (ditiotreitól) 5 mM y finalmente se resuspendió el sedimento en 2 ml de tampón sacarosa que contenía 20 µg de tripsina de calidad para secuenciación (Promega, V5113). Se incubó la suspensión durante 30 minutos a 37 °C y, a continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 3500 fcr a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 14000 fcr a 4 °C. De nuevo, se retiró el sobrenadante y se filtró a través de un filtro estéril para jeringuillas (0,2 µm, Nalgene n.º 194-2520). A 0,75 ml de filtrado se añadieron 0,75 µl de ácido fórmico, se mezcló y almacenó a -70 °C hasta ser analizado mediante EM.

1.2.1.3 Análisis mediante EM de hidrolizado tripsínico

20 Se identificaron los péptidos mediante espectroscopía de masas (nano CL-EM/EM con fragmentación inducida por colisión dependiente de los datos) en el Departamento de Investigación Clínica, Universidad de Berna (Suiza) por el grupo del Dr. Manfred Heller. Se usó la base de datos UniprotKB (The UniProt Consortium, Nucleic Acids Res. 39: D214-D219, 2011), sin entradas de *Firmicutes* y *E. coli*, para asignar péptidos a proteínas.

25 En resumen, se cargó un volumen de 3 µl o 6 µl en una precolumna (Magic C18, 5 µm, 300 Å, 0,15 mm de d.i. x 30 mm de longitud) a un caudal de ~5 µl/min con disolvente A (ácido fórmico al 0,1 % en agua/acetonitrilo 98:2). Después de la carga, se eluyeron los péptidos en modo de flujo inverso sobre la nanocolumna analítica (Magic C18, 5 µm, 100 Å, 0,075 mm de d.i. x 75 mm de longitud) usando un gradiente de acetonitrilo de un 5 % a un 40 % de disolvente B (ácido fórmico al 0,1 % en agua/acetonitrilo 4,9:95) en 60 min a un caudal de ~400 nl/min. Se acopló directamente el efluente de columna a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) por medio de una fuente de ESI por nanopulverización que funcionaba a 1,700 kV. La adquisición de datos se efectuó en modo dependiente de los datos con barridos de iones precursores registrados en el detector de transformada de Fourier (TF) con una resolución de 60.000 (a m/z =400) en paralelo a cinco espectros de fragmentos (CID) de los iones precursores más intensos en la trampa iónica lineal. La configuración del modo CID fue: Activación de banda ancha encendida; selección de ion precursor entre el intervalo m/z 360-1400; umbral de intensidad a 500; precursores excluidos para 35 15 s. La interpretación de los espectros CID se realizó con PHENYX sobre un servidor de procesador de cuatro núcleos dual local ejecutado en Linux usando las bases de datos UniProtKB SwissProt y TrEMBL. Las modificaciones variables permitidas fueron: oxidación de Met (limitada a 2), desaminación de Asn/Gln (2), y pirrolidona ácido carboxílico sobre Glu N-terminal (1). Las tolerancias de masa de precursor y fragmento se fijan en 20 ppm y 0,5 Da, respectivamente. Las identificaciones de proteínas se aceptaron como verdadero positivo si al menos se identificaron 40 dos péptidos diferentes, que dieron como resultado una puntuación de proteína de ≥ 10,0.

1.2.1.4. Análisis de los datos y selección de dianas

45 Varias proteínas identificadas fueron proteínas intracelulares de proteínas altamente abundantes, tales como proteínas ribosómicas. Para discriminar entre dichos contaminantes y supuestas dianas de membrana, las proteínas identificadas se analizaron para determinar su localización en las bacterias usando herramientas en línea disponibles públicamente. (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui-gramn/sosuigramn_submit.html, K. Imai *et al.*, Bioinformatics 2(9), 417-421, 2008). Las proteínas que se asignaron como proteína de membrana externa o extracelular se seleccionaron para un análisis adicional. Además, también se seleccionaron las proteínas que se anotaron por la base de datos de UniProtKB como un homólogo de proteínas de membrana externa o extracelulares conocidas.

1.2.2. Proteómica comparativa

55 El concepto de este procedimiento es centrarse en polipéptidos para los que la expresión se confirma experimentalmente en diversas y diferentes cepas de *Acinetobacter*. Por consiguiente, se determinó el proteoma completo de cinco cepas de *A. baumannii* mediante espectrometría de masas. Las cinco cepas se seleccionaron debido a sus diversas fuentes de aislamiento. Para enriquecer las supuestas dianas que están presentes en la superficie extracelular, las preparaciones de proteínas se enriquecieron en proteínas de membrana externa antes del análisis por EM de acuerdo con sus propiedades hidrófilas e hidrófobas. Los péptidos identificados mediante espectroscopía de masas se asignaron a proteínas usando bases de datos disponibles públicamente y se seleccionaron de acuerdo con predicciones de TI y búsquedas bibliográficas.

1.2.2. Preparación de cultivos bacterianos

65 Se sembraron en estrías las cepas de *A. baumannii* ATCC19606, BMBF65, SDF, ACICU, AYE (véase la tabla 6,

anteriormente) en placas BHI-agar y se incubaron durante la noche (16h-24 h) a 37 °C. Las placas de agar, que contenían colonias bacterianas visibles, se usaron para inocular 75 ml de LB y los cultivos se incubaron durante 25 h a 37 °C agitando a 200 rpm. Se midió la DO₆₀₀ de los cultivos y se inoculó LB (0,51) con cultivo de durante la noche a una DO₆₀₀ de partida de 0,02. Los cultivos de 0,5 l se incubaron durante la noche a 37 °C agitando a 200 rpm. Se midió la DO₆₀₀ y se usaron 900 DO/ml de cada cultivo para la preparación de proteínas.

1.2.2.2 Preparaciones de proteínas de membrana externa (ME)

Las proteínas ME se prepararon esencialmente como se describe previamente por Arnold y Linke (Curr Protoc Protein Sci.; capítulo 4:unidad 4.8.1-4.8.30., 2008) con ligeras modificaciones para preparar proteínas ME para posterior análisis adicional. Se sedimentaron 900 DO/ml a 4 °C durante 20 minutos y 4000 g. Todas las siguientes etapas se realizaron en hielo con soluciones enfriadas y aparato a 0 °C a 4 °C. Se resuspendieron las bacterias en 7 ml de tampón de resuspensión (NaCl 0,1 M, MgCl₂ 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH=8,0, 10 mg/l de DNasa I (Sigma-Aldrich,)) y se añadió 0,1 ml de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). La suspensión se sometió a sonicación 5 veces durante 10 segundos al nivel 5 usando el Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company, CT, EE. UU.) con intervalos de 1 minuto en hielo. El lisado se incubó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 2000 g durante 15 minutos para retirar las bacterias intactas. Se transfirió el sobrenadante a tubos de centrifuga, aptos para ultracentrifugación, y se añadió el tampón de resuspensión hasta un volumen final de 12 ml. La solución se centrifugó a 100.000 g y 4 °C durante 1 hora. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 12 ml de tampón de resuspensión que contenía 0,1 ml de cóctel inhibidor de proteasas. Se repitió la ultracentrifugación y se resuspendió el sedimento en 12 ml de tampón CM (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 50 mM, pH=8,0, 1 % (p/v) de N-lauroilsarcosinato de sodio (Fluka)). Se añadió 0,1 ml de cóctel inhibidor de proteasas a la suspensión y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos mediante rotación del tubo sobre un mezclador intelli (LTF Labortechnik, Alemania) fijado a un ángulo de 90 ° y 25 rotaciones por minuto. La solución se ultracentrifugó y el sedimento se lavó tres veces en 12 ml en ddH₂O fría mediante resuspensión y ultracentrifugación como se describe anteriormente. En esta fase, se congeló el sedimento a -20 °C hasta su uso posterior. La preparación de proteínas ME se precipitó con cloroformo/metanol (Wessel D. and Flügge U., Anal. Biochem. 138, 141-143, 1984) dividiendo la preparación de proteínas ME en dos alícuotas que contenían un 45 % y una alícuota que contenía un 10 % restante. Los sedimentos pílidas se almacenaron a -20 °C. Para la cuantificación de proteínas la alícuota con un 10 % precipitada con cloroformo/metanol se resuspendió en 0,1 ml de agua de los cuales 50 µl se hidrolizaron con 50 µl de NaOH 1 M durante 2 minutos a temperatura ambiente y neutralizaron con 0,1 ml de HCl 0,5 M. Se valoró la muestra hidrolizada y se cuantificaron las proteínas usando el reactivo de proteínas de Bradford (Biorad, CA; EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó seroalbúmina bovina valorada, hidrolizada como las muestras, como un patrón para la cuantificación.

1.2.2.3 Determinación del proteoma ME - CL-EM y análisis de los datos

Se solubilizaron las proteínas en solución de urea 8 M, se redujeron con DTT 1 mM durante 30 min a 37 °C y se alquilaron con yodoacetamida 55 mM durante 30 min en oscuridad a 25 °C. A continuación, las muestra se diluyeron con tampón bicarbonato de amonio 0,1 M hasta una concentración final de urea de 1 M. Se digirieron las proteínas mediante incubación con tripsina modificada de calidad para secuenciación (1/100; p/p, Promega, Madison, WI) durante la noche a 37 °C. Se desalaron los péptidos en columnas de centrifugación de fase inversa C18 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Microspin, Harvard Apparatus), se secaron al vacío y almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

Se analizaron las mezclas de péptidos usando nano-CL-EM de alta resolución en un espectrómetro de masas híbrido que consistía en un cuadrupolo trampa iónica lineal y un Orbitrap (LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific). Se analizaron los péptidos dos veces en un sistema de nano CL Eksigent Nano (Eksigent Technologies) conectado a un espectrómetro de masas híbrido que consistía en un cuadrupolo trampa iónica lineal y un Orbitrap (LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific), que se estaba equipado con una fuente de iones de nanoelectropulverización (Thermo Scientific). La separación de péptidos se llevó a cabo en una columna de RP-HPLC (75 µm de diámetro interno y 10 cm de longitud) empaquetada en fábrica con resina C18 (Magic C18 AQ 3 µm; Michrom Bioresources) usando un gradiente lineal de disolvente A al 95 % (agua, ácido fórmico al 0,1 %, y acetonitrilo al 2 %) y disolvente B al 5 % (agua, ácido fórmico al 0,1 %, y acetonitrilo al 98 %) con respecto a disolvente A al 72 % y disolvente B al 28 % durante 60 min a un caudal de 0,3 µl/min. Se hizo funcionar el LTQ-Orbitrap en modo de adquisición dependiente de los datos con el programa informático Xcalibur. Se adquirieron los espectros de EM de barrido de inspección en el Orbitrap en el intervalo 350-2000 m/z con la resolución fijada en un valor de 60.000. Los cinco iones más intensos por barrido de inspección se seleccionaron para fragmentación por disociación inducida por colisión (CID), y se analizaron los fragmentos resultantes en la trampa lineal (LTQ). Se usó la exclusión dinámica dentro de 30 s para prevenir la selección repetitiva del mismo péptido. Los iones cargados individualmente e iones con estados de carga no asignados se excluyeron del desencadenamiento de barridos EM/EM.

Los ficheros de datos brutos de los instrumentos de EM se convirtieron con ReAdW en archivos mzXML y los archivos mzXML se buscaron con Sorcerer-SEQUEST (Eng *et al.*, J Am Soc Mass Spectrom. 1994;5(11): 976-989) con respecto a la base de datos de proteínas de *Acinetobacter baumannii* (ACIB3) de la base de conocimiento de proteínas UniProtKB/Swiss-Prot (versión 56,9) que contiene 3453 entradas de proteínas (292 en UniProtKB/Swiss-Prot + 3161

en UniProtKB/TrEMBL). El análisis estadístico de cada resultado de búsqueda para cada análisis por CL-EM se realizó usando el Trans-Proteomic Pipeline TPP (Keller *et al.*, Mol Syst Biol. 2005;1:2005.0017): v4.0 JETSTREAM rev 2 que incluye PeptideProphet (Keller A, *et al.*, Anal. Chem. 2002;74(20): 5383-5392) y ProteinProphet (Nesvizhskii *et al.*, Anal. Chem. 2003; 75(17):4646-4658). La puntuación de probabilidad de ProteinProphet se fijó en 0,9, lo que dio como resultado una tasa de falso descubrimiento promedio de proteínas y péptidos de menos de un 1 % para todos los resultados de búsqueda estimados por ProteinProphet y PeptideProphet.

Los criterios de búsqueda en la base de datos incluyeron: tolerancia de masa de 50 ppm para los iones precursores, modificaciones variables de 15,994920 Da para metioninas (que representan metioninas oxidadas), 57,021465 Da para carbamidometilación como modificación estática para cisteínas, al menos un extremo tripsínico por péptido, y hasta dos sitios de escisión no alcanzados.

1.2.2.4 Análisis de los datos y selección de dianas

Para seleccionar las supuestas dianas del proteoma ME, las proteínas identificadas de 5 cepas diferentes (véase anteriormente, tabla 6) se analizaron para determinar su localización en las bacterias usando herramientas en línea disponibles públicamente (PSORTb v3.0, Yu *et al.*, Bioinformatics 26(13):1608-1615, 2010). Se analizaron individualmente en detalle las proteínas que estaban presentes en el proteoma ME de todas las 5 cepas y se predijo que se localizaban bien extracelularmente o con respecto a la membrana externa. Esto incluyó la comunicación genómica entre 14 genomas de referencia disponibles públicamente (presencia/ausencia de gen y porcentaje de identidad de aminoácidos) y la topología predicha de la proteína dentro en la membrana externa usando la herramienta en línea disponible públicamente HHPred (Söding *et al.*, Nucleic Acids Res. 2005 Jul 1; 33 (ejemplar de servidor web): W244-8.). También se consideró si había bibliografía disponible referente a la proteína de *Acinetobacter* identificada u homólogos en otras especies.

Las proteínas que (1) se codificaron por al menos 13 de 14 genomas analizados con una comunicación de aminoácido de ≥ 90 % y (2) se predijo que presentan partes de la secuencia de proteínas en el lado extracelular de la membrana externa se consideraron como supuestas dianas para anticuerpos. En aquellos casos en los que la bibliografía predijo que los homólogos de dichas supuestas dianas para anticuerpos estaban regulados por disminución o ausentes en cepas de *A. baumannii* resistentes a antibióticos, las dianas ya no se siguieron. Por ejemplo, la proteína de membrana externa CarO demostró previamente que estaba regulada por disminución en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos (Mussi *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. Apr; 49(4): 1432-40, 2005). A pesar del hecho de que se identificó la diana por proteómica comparativa, así como selección de diana específica, se consideró CarO como una diana de poca pertinencia clínica y, por lo tanto, no se investigó adicionalmente.

1.2.3. Identificación de dianas específicas

Este procedimiento se centra en dianas específicas que se reconocen por anticuerpos presentes en sueros de pacientes con *A. baumannii* convalecientes. Por consiguiente, las preparaciones de proteínas ME enriquecidas en proteínas de membrana externa se separaron mediante electroforesis bidimensional en gel (2DE). La 2DE consistía en un isoelectroenfoque (IEE) seguido de una etapa de SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para redissolver las proteínas ME. Se determinaron las proteínas reconocidas por los sueros de pacientes mediante análisis de inmunotransferencia. Para incrementar la probabilidad de identificar las proteínas que se expresan por diversas cepas, se compararon las inmunotransferencias de al menos dos cepas de *A. baumannii* y las proteínas presentes en todas las cepas analizadas se seleccionaron para la identificación de proteínas mediante análisis por EM. Las proteínas se caracterizaron individualmente y se seleccionaron de acuerdo con predicciones de TI y búsquedas bibliográficas.

1.2.3.1 Preparación de cultivos bacterianos y preparaciones de proteínas ME

Se usaron las cepas de *A. baumannii* ATCC19606, BMBF-65 y Berlín-95 (véase la tabla 6) para generar la preparación de proteínas ME como se describe en 1.2.2.2.

1.2.3.2 Electroforesis bidimensional en gel (2DE)

El isoelectroenfoque (IEE) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare, Reino Unido) usando el sistema de IEE Ettan™ IPGphor™ 3 (GE Healthcare). En resumen, se rehidataron tiras secas de 7 cm pH3-10 NL de inmovilina (GE Healthcare) durante la noche a temperatura ambiente en 125 μ l de solución de rehidratación (Urea 8 M (Sigma-Aldrich), CHAPS al 2 % (Sigma-Aldrich), DTT 40 mM (Fluka), tampón IPG al 0,5 % (GE Healthcare), azul de bromofenol al 0,002 %). Las preparaciones ME (20-30 μ g) se disolvieron en 50-100 μ l de solución de rehidratación, se mezclaron en vórtex durante 30 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante varios minutos. A continuación, se centrifugó la muestra durante 2 minutos a >14000 g y el sobrenadante se usó para EIE. La muestra se cargó por duplicado sobre las tiras secas de inmovilina rehidratadas usando el sistema de recipiente de carga y se revistió con aceite mineral. Las proteínas se separaron usando las condiciones de ejecución 300 V durante 1 h, gradiente lineal 300 V-1000 V durante 30 minutos, gradiente lineal 1000 V-5000 V durante 1 h y 30 minutos y 5000 V para 36 minutos. Las tiras se congelaron inmediatamente a -20 °C.

La 2.º dimensión se realizó exactamente como se describe por las instrucciones del fabricante (Invitrogen, EE. UU.) usando geles NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris ZOOM® (Invitrogen) y 10 µl de Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard (Invitrogen). Se usó un duplicado de los geles para la transferencia sobre membranas de nitrocelulosa (Invitrogen) como se describe por las instrucciones del fabricante para geles de Tris-glicina (Invitrogen), usando 30 V durante 80 minutos como condiciones de ejecución. La membrana de nitrocelulosa se tiñó con solución de Ponceau S (Sigma-Aldrich) y se registró una imagen. La membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en tampón de bloqueo (leche desnatada al 5 % (Fluka) en PBS-T (PBS que contenía Tween 20® al 0,05 % (Sigma-Aldrich)). Se diluyeron 1:500 sueros de pacientes individuales o mezclas en tampón de bloqueo y se incubaron con la membrana durante la noche a 4 °C. Se lavó la membrana tres veces durante cinco minutos en PBS-T y se incubó con un anticuerpo secundario específico para IgG humana de (Invitrogen) a una dilución de 1:1000 en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la membrana de nuevo tres veces y se detectó el anticuerpo unido usando sustrato TMB (Promega). Las proteínas que se detectaron mediante un suero de paciente dado en todas las cepas de *A. baumannii* sometidas a prueba, se seleccionaron para la identificación de proteínas. Por lo tanto, se visualizaron las proteínas en el segundo duplicado de los geles de 2DE con Instant Blue TM (Expedeon, Cambridgeshire, UK). Las proteínas positivas en inmunotransferencias se localizaron en el gel por duplicado comparando el patrón de proteína del gel con el patrón de proteína de la membrana teñida con Ponceau S y las señales de inmunotransferencia. Los puntos de proteínas se extrajeron y se almacenaron a -80 °C hasta la identificación de proteínas mediante análisis por EM.

1.2.3.3. Análisis por EM de hidrolizado tripsínico

Las proteínas fueron identificadas a partir de fragmentos de gel extraídos mediante CL/ESI/EM/EM por el Protein Analysis Group, Functional Genomics Center Zurich, Suiza, usando el procedimiento estándar. En resumen, las piezas de gel se lavaron dos veces con 100 µl de NH₄HCO₃ 100 mM/acetoniitrilo al 50 %, se lavaron con 50 µl de acetoniitrilo. Los tres sobrenadantes se desecharon y se añadió 10 µl de tripsina (100 ng en Tris 10 mM/CaCl₂ 2 mM, pH 8,2), 20 µl de tampón (Tris 10 mM/CaCl₂ 2 mM, pH 8,2) y se incubó durante la noche a 37 °C. Se retiró el sobrenadante y se extrajeron dos veces las piezas de gel con 100 µl de TFA al 0,1 %/acetoniitrilo al 50 %. Los tres sobrenadantes se combinaron y se secaron. La muestra se disolvió en 25 µl de ácido fórmico al 0,1 % y se transfirió a un vial de inyector automático para CL/EM/EM. A continuación, se inyectaron 5 µl para la identificación de péptidos. Se realizaron las búsquedas en la base de datos usando los programas de búsqueda ProteinLynx Global Server (SwissProt, todas las especies) y Mascot (NCBIInr, todas las especies).

1.2.3.4. Análisis de los datos y selección de dianas

Las proteínas que se identificaron como proteína de *A. baumannii* y se predijo que eran o se anotaron como una proteína de membrana externa se eligieron como supuestas dianas. No se siguieron más las dianas en casos en los que la bibliografía predijo que los homólogos de dichas supuestas dianas para anticuerpos estaban regulados por disminución o ausentes en cepas de *A. baumannii* resistentes a antibióticos.

Ejemplo 2: predicciones de TI

Para las predicciones de TI de estructura de proteínas se usó el Bioinformatics Toolkit del Instituto Max Planck para Biología del Desarrollo en Tubinga (Biegert *et al.*, Nucleic Acids Res. 34, W335-339). Las estructuras terciarias se predijeron usando la herramienta HHpred (Söding J. *et al.*, Bioinformatics, 2005, 21, 951-960) que construye un modelo oculto de Markov (HMM) de la secuencia de consulta y lo compara con una base de datos de HMM, que representan las familias de proteínas anotadas (por ejemplo, PFAM, SMART, CDD, COGs, KOG) o dominios con estructura conocida (PDB, SCOP). Como una configuración la predicción en línea, se usó la base de datos de HMM pdb70_3Sep11 y se fijaron HHblits al procedimiento de generación de MSA con 3 iteraciones como máximo y modo de alineamiento local. Se presupuso que las estructuras predichas eran verdaderas con una alta probabilidad de ser un verdadero positivo (>90 %) y una homología que cubre la mayoría de la secuencia de consulta. Cuando múltiples resultados satisficieron los requisitos, se usaron los dos resultados con la probabilidad más alta y los valores de E y de P más bajos como representantes de la estructura terciaria. En la tabla 4 se asignan las estructuras terciarias predichas representantes con respecto a las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y se pueden descargar desde servidor en línea pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Wang Y. *et al.*, Nucleic Acids Res. 2007 Jan; 35 (ejemplar de base de datos): D298-300.).

Predicción de la secuencia líder N terminal:

La secuencia líder N terminal se determinó usando el SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>, Bendtsen J.D. *et al.*, J. Mol. Biol., 340:783-795, 2004) para bacterias gramnegativas usando modelos ocultos de Markov y redes neuronales.

Predicción de la localización subcelular de proteínas:

Se usó la herramienta en línea disponible públicamente Psortb v3.0 (<http://www.psort.org/psortb/>, Yu *et al.*, 2010,

Bioinformatics 26(13):1608-1615) para la predicción de la localización subcelular. Como configuración, se eligieron las "bacterias" y "tinción gramnegativa" para la predicción. Las secuencias de proteínas se introdujeron como un código de aminoácidos de una única letra.

- 5 Para el análisis shedome, se usó herramienta en línea disponible públicamente SOSUI_{GramN} (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuigramn/sosuigramn_submit.html; Imai *et al.*, Bioinformatics 2(9), 417-421 (2008)), que introduce las secuencias de proteínas como un código de aminoácidos de una única letra.

Determinación de la conservación de aminoácidos y prevalencia génica:

- 10 Para la determinación de la prevalencia génica y conservación de aminoácidos, se introdujo la secuencia de aminoácidos que se iba a analizar en la herramienta en línea blast genómica "tblastn" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi, Cummings L, *et al.*, FEMS Microbiol Lett. 2002 Nov 5;216(2):133-8; Altschul *et al.*, Nucl Acid Res., 25:3389-3402, (1997)) como secuencia de consulta usando el código de una única letra de aminoácidos. Se seleccionaron todas las bases de datos genómicas de *A. baumannii*. Se eligieron los parámetros de BlastP predeterminados (Matriz BLOSUM62, Costes por huecos por abrir=11, Costes por huecos por extender = 1, usando filtro de complejidad baja y estadísticas basadas en composición). Los valores esperados que se iban a aceptar se mantuvieron en una configuración predeterminada de 10. De los resultados, se usó la prevalencia y el porcentaje identidad de aminoácidos entre los genomas de referencia (tabla 4) para la selección de dianas.

- 20 En los casos en los que se usó una secuencia de ADN como secuencia de consulta, en su lugar se usó BLASTN, usando la configuración predeterminada (Matriz BLOSUM62, Costes por huecos por abrir=5, Costes por huecos por extender=2, Puntuaciones de emparejamiento = 2, Puntuaciones de desemparejamiento = -3). Dependiendo de la longitud de la secuencia, el programa usó un filtro de complejidad baja o fuerte.

Ejemplo 3: generación de vectores de expresión para la generación de antígenos recombinantes

- 30 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de *A. baumannii* (ATCC19606) usando cebadores que contenían sitios de restricción apropiados para la clonación. Los productos de PCR se clonaron en el marco en el vector de expresión pET-28a(+) (Novagen; Alemania) dando como resultado la proteína recombinante con un marca His N terminal. Todos los oligonucleótidos se generaron en Microsynth (Balgach, Suiza). Para AB023, AB024, AB025, AB030, FimA, CsuAB y OmpA se clonó la secuencia codificante completa (cds) sin el péptido señal N terminal. La secuencia líder N terminal se determinó y retiró para la clonación y expresión de proteínas recombinantes. Para AB031, se clonó el bucle extracelular de 78 aminoácidos, puesto que fue la única región de más de 2 aminoácidos en esta molécula que se predecía que estaba en el lado extracelular y, por lo tanto, accesible a anticuerpos. Los plásmidos de expresión se secuenciaron en Microsynth para excluir artefactos de PCR. Las SEQ ID NO: 33 y 34 muestran la secuencia de nucleótidos del cebador de secuenciación T7 y término T7, respectivamente. Se usó un cebador de secuenciación adicional, que consistía en la secuencia de nucleótidos descrita como SEQ ID NO: 35, para el vector de expresión de AB030 descrito en el ejemplo 3.4.

3.1 Vector de expresión para AB023 (SEQ ID NO: 1)

- 45 El SignalP 3.0 Server predijo una secuencia señal N terminal en la posición 1-26 para SEQ ID NO: 2. Los oligonucleótidos oAB023wss GGCAGGATCCGCTGCTGCATTGACCC (SEQ ID NO: 17) y oAB023as CGGAATGTCGACT-TAGAATGCAGTTG (SEQ ID NO: 18) se diseñaron para unirse en la posición 76-95 y 1241-1254 de SEQ ID NO: 1 respectivamente. Los sitios de restricción, añadidos a los oligonucleótidos oAB023wss y oAB023as para la clonación, están subrayados. Los homólogos de cds para SEQ ID NO: 1 posición 76-1254 se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de ATCC19606 usando la Pfx Polymerase (Invitrogen) y el par de oligonucleótidos oAB023wss/oAB023as. Por 50 µl de reacción, se usaron 50 ng de ADN genómico, 1 U de Pfx polymerase, MgSO₄ 1 mM, 2x tampón pfx, dNTP 0,3 mM (cada uno), oligonucleótido 0,3 µM (cada uno). El programa de termociclador de PCR fue (94 °C, 4 min) 35x(94 °C, 15 s; 55 °C, 30 s; 65 °C, 2 min) (65 °C, 5 min). El producto de PCR se purificó usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN, 28704) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se digirieron el producto de PCR purificado y 100 ng del vector pET-28a(+) usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I (Fermentas, ER0051, ER0641) y los hidrolizados se purificaron usando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN, 28104) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente el vector de 50 ng se fijó en una proporción molar de 1:2 con el producto de PCR durante 2 h a temperatura ambiente usando 2 unidades de ligasa (Fermentas, Canadá) en un volumen total de 20 µl y 1x de tampón ligasa (suministrado con ligasa). La reacción de fijación se transformó en *E. coli* quimiocompetente (DH5α) y se seleccionó en placas de LBA que contenían 50 µg/ml de canamicina (Applicem) usando procedimientos estándar (Maniatis). Se seleccionaron las colonias resistentes para determinar la purificación de ADN plasmídico usando kits disponibles comercialmente (Promega, WI, USA or QIAGEN, Alemania) y los plásmidos purificados se secuenciaron en Microsynth (Balgach, Suiza) usando los cebadores de secuenciación estándar T7 (TAATACGACTCACTATAGG) y término T7

(TGCTAGTTATTGCTCAGCGG) para verificar la integración correcta del producto de PCR. El vector de expresión para AB023 codificó la misma secuencia de aminoácidos como se esperaba a partir de la secuencia genómica de *Acinetobacter* de ATCC19606 (DOCDE3) excepto por el péptido señal (aminoácidos 1-26) que se reemplazó por la marca His del vector.

3.2 Vector de expresión para AB024 (SEQ ID NO: 3)

El SignalP 3.0 Server predijo una secuencia señal N terminal en la posición 1-29 para SEQ ID NO: 4. Los oligonucleótidos oAB024wss GGCAGGATCCGCAACTTCTGATAAAGAG (SEQ ID NO: 19) y oAB024as CAAAGTCCGACT-TAGAAGCTATATTTAGCC (SEQ ID NO: 20) se diseñaron para unirse en la posición 88-105 y 1287-1305 de SEQ ID NO: 3 respectivamente. Los sitios de restricción, añadidos a los oligonucleótidos oAB024wss y oAB024as para la clonación, están subrayados. Los homólogos de cds para SEQ ID NO: 3 posición 88-1305 se amplificaron por PCR y se clonaron en pET-28a(+) exactamente como se describe para el vector de expresión de AB023.

El vector de expresión para AB024 codificó la misma secuencia de aminoácidos como se esperaba a partir de la secuencia genómica de *Acinetobacter* de ATCC19606 (D0CDN5) excepto por el péptido señal (aminoácidos 1-29) que se reemplazó por la marca His del vector.

3.3 Vector de expresión para AB025 (SEQ ID NO: 5)

El SignalP 3.0 Server predijo una secuencia señal N terminal en la posición 1-21 para SEQ ID NO: 6. Los oligonucleótidos oAB025wss TCGCGGATCCCAAGGTTTAGTGCTTAATAATGATG (SEQ ID NO: 21) y oAB025as CGACAAGCTTAGAAACCAACATTTTACGCTC (SEQ ID NO: 18) se diseñaron para unirse en las posiciones 67-88 y 1422-1446 de SEQ ID NO: 5 respectivamente. Los sitios de restricción, añadidos a los oligonucleótidos oAB025wss y oAB025as para la clonación, están subrayados. Los homólogos de cds para seq5 la posición 67-1446 se amplificaron por PCR y se clonaron en pET-28a(+) exactamente como se describe para el vector de expresión de AB023 con la modificación de que se usó la enzima de restricción *HindIII* (Fermentas, ER0501) en lugar de *SaI*.

El vector de expresión para AB025 codificó la misma secuencia de aminoácidos como se esperaba a partir de la secuencia genómica de *Acinetobacter* de ATCC19606 (D0C8X7) excepto por el péptido señal (aminoácidos 1-21) que se reemplazó por la marca His del vector.

3.4 Vector de expresión para AB030 (SEQ ID NO: 7)

El SignalP 3.0 Server predijo una secuencia señal N terminal en la posición 1-44 para SEQ ID NO: 8. Los oligonucleótidos oAB030wss CTTGTGGATCCCAAAGTTCCGGCTGAGACC (SEQ ID NO: 23) y oAB030as AAAGTCCGACT-TAAAGTTGTGGACCAATAAAGAAAATG (SEQ ID NO: 24) se diseñaron para unirse en la posición 133-150 y 2695-2721 de SEQ ID NO: 7 respectivamente. Los sitios de restricción, añadidos a los oligonucleótidos oAB030wss y oAB030as para la clonación, están subrayados. Los homólogos de cds para SEQ ID NO: 7 posición 133-2721 se amplificaron por PCR y se clonaron en pET-28a(+) exactamente como se describe para el vector de expresión de AB023 con la modificación de que se incrementó el tiempo de elongación de la PCR a 2 min 30 s y el número de ciclos se redujo a 30.

El vector de expresión para AB030 codificó la misma secuencia de aminoácidos como se esperaba a partir de la secuencia genómica de *Acinetobacter* de ATCC19606 (D0C629) excepto por el péptido señal (aminoácidos 1-44) y el aminoácido en la posición 58 que codifica una treonina en lugar de serina. Puesto que los homólogos de AB030 en otras cepas de *Acinetobacter baumannii* (por ejemplo, AB307-B7H123) contienen una treonina en esta posición, se toleró esta diferencia a partir de la secuencia esperada.

3.5 Vector de expresión para AB031L (SEQ ID NO: 9)

Se usó la detección de homología y el programa informático de predicción HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>, Söding *et al.*, *Nucleic Acids Res.*;33 (ejemplar de servidor web): W244-8, 2005 Jul 1) para predecir la estructura de AB031. Se predijo un homólogo estructural de AB031 (ID de proteína de Pubmed 1ek9 - proteína de membrana externa TOLC) con la probabilidad más alta (un 100 %) y un valor de E (0) de la significación estadística más alta. El alineamiento predijo que la secuencia de 78 aminoácidos en la posición 87-164 de SEQ ID NO: 10 estaba localizada con respecto al lado extracelular de las bacterias.

Los oligonucleótidos oAB031L1wss AAAGGATCCAGAGCATATGCTTTTCATAGTG (SEQ ID NO: 25) y oAB031L1as AAAGTTCGACTTAAGATGGTCCGACTACTTGGTCTTCT (SEQ ID NO: 26) se diseñaron para amplificar el bucle de 78 aminoácidos por PCR. Los sitios de restricción, añadidos a los oligonucleótidos oAB031L1ss y oAB031L1as para la clonación, están subrayados. Los homólogos de cds de la secuencia de 78 aminoácidos se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de ATCC19606 usando la Dream-Taq polimerasa (Fermentas, EP0701) y el par de oligonucleótidos oAB031L1wss/oAB031L1as. Por 50 µl de reacción, se usaron 50 ng de ADN genómico, 0,5 U de taq polimerasa, 1x tampón taq, dNTP 0,2 mM (cada uno), oligonucleótido 0,2 µM (cada uno). El programa de termociclador de PCR fue (94 °C, 3 min) 5x(94 °C, 15 s; 50 °C, 15 s; 72 °C, 2 min) 25x(94 °C, 15 s; 55 °C, 15 s; 72 °C, 2 min) (72 °C, 5 min). El producto de PCR se clonó en pET-28a(+) como se describe para el vector de expresión de AB023. El vector de expresión para AB031L1 codificó la misma secuencia de aminoácidos como se esperaba a partir de la secuencia de 78 aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

3.6 Vector de expresión para FimA (SEQ ID NO: 11)

El SignalP 3.0 Server predijo una secuencia señal N terminal en la posición 1-20 para SEQ ID NO: 12. Los oligonucleótidos oFimAwss GGACGAGGATCCGCTGATGGTACAATTACA (SEQ ID NO: 27) y oFimAas AACTAAGCTT- TCAACCCATTGATTGAGCAC (SEQ ID NO: 28) se diseñaron para unirse en la posición 61-78 y 392-407 de SEQ ID NO: 12 respectivamente. Los sitios de restricción, añadidos a los oligonucleótidos para la clonación, están subrayados. Los homólogos de cds para seq11 posición 61-407 se amplificaron por PCR y se clonaron en pET-28a(+) exactamente como se describe para el vector de expresión de AB025.

El vector de expresión para FimA codificó la misma secuencia de aminoácidos como se esperaba a partir de la secuencia genómica de *Acinetobacter* de ATCC19606 (D0C767) excepto por el péptido señal (aminoácidos 1-20) que se reemplazó por la marca His del vector.

3.7 Vector de expresión para CsuAB (SEQ ID NO: 13)

El SignalP 3.0 Server predijo una secuencia señal N terminal en la posición 1-23 para SEQ ID NO: 14. Los oligonucleótidos oCsuABwss AATACTGGATCCGCTGTTACTGGTCAG (SEQ ID NO: 29) y oCsuABas AACTAAGCTTTTA- GAAATTTACAGTGAATAAGAG (SEQ ID NO: 30) se diseñaron para unirse en la posición 70-84 y 512-537 de SEQ ID NO: 13 respectivamente. Los sitios de restricción, añadidos a los oligonucleótidos oCsuABwss y oCsuABas para la clonación, están subrayados. Los homólogos de cds para SEQ ID NO: 13 posición 70-537 se amplificaron por PCR y se clonaron en pET-28a(+) como se describe para el vector de expresión de AB025.

El vector de expresión para FimA codificó la misma secuencia de aminoácidos como se esperaba a partir de la secuencia genómica de *Acinetobacter* de ATCC19606 (D0C5S9) excepto por el péptido señal (aminoácidos 1-23) que se reemplazó por la marca His del vector.

3.8 Vector de expresión para OmpA (SEQ ID NO: 15)

El SignalP 3.0 Server predijo una secuencia señal N terminal en la posición 1-22 para SEQ ID NO: 16. Los oligonucleótidos oOmpAwss CTGCTGAATTCGGCGTAACAGTTACTCC (SEQ ID NO: 31) y oOmpAas CAAGAAAGCTTAT- TATTGAG (SEQ ID NO: 32) se diseñaron para unirse en la posición 67-83 y 1064-1071 de SEQ ID NO: 15 respectivamente. Los sitios de restricción, añadidos a los oligonucleótidos oOmpAwss y oOmpAas para la clonación, están subrayados. Los homólogos de cds para SEQ ID NO: 15 posición 67-1071 se amplificaron por PCR y se clonaron en pET-28a(+) exactamente como se describe para el vector de expresión de AB023 con la modificación de que se usaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas, ER0271, ER0501) en su lugar.

El vector de expresión para OmpA codificó la misma secuencia de aminoácidos como se esperaba a partir de la secuencia genómica de *Acinetobacter* de ATCC19606 (D0CDF2) excepto por el péptido señal (aminoácidos 1-22) que se reemplazó por la marca His añadida del vector.

Ejemplo 4: expresión y purificación de proteínas recombinantes

4.1 Expresión de proteínas recombinantes en *E.coli*.

Para la expresión recombinante de proteínas con marca His, se transformaron *E. Coli* BL-21(DE3) quimiocompetentes con los vectores de expresión individuales descritos anteriormente y se seleccionaron sobre placas de LBA que contenían 50 µg/ml de canamicina usando procedimientos estándar. Se usó el cultivo de durante la noche en LB que

5 contenía 50 µg/ml de canamicina de colonias resistentes para iniciar un cultivo en LB de 0,5 l que contenía 50 µg/ml de canamicina a una DO_{600} de 0,2 o más baja. Se incubó el cultivo a 37 °C y 200 rpm hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0,5-1. Se añadió IPTG (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mM y las bacterias se incubaron adicionalmente a 37 °C y 200 rpm durante 3-4 h. Se centrifugaron las bacterias (3500 g, 10 min) y el sedimento se congeló a -20 °C.

5 4.2 Extracción de proteínas recombinantes a partir de sedimentos bacterianos de *E. coli*.

10 Se resuspendió el sedimento celular bacteriano en 10 ml de tampón de ruptura celular (NaCl 0,15 M, $MgCl_2$ 10 mM, Tris-HCl 20 mM, pH=8,0, 10 mg/l ADNasa I), la suspensión se sometió a sonicación en hielo como se describe en 1.2.2.2 y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó la suspensión (4000 g, 10 min a 4 °C), se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 ml de tampón detergente (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 20 mM, pH=8,0, TritonX 100 al 1 %) mediante fuerzas mecánicas. Se centrifugó la suspensión a 8000 g y 4 °C durante 10 minutos. En el caso de AB031L1 con marca his, el sobrenadante se complementó con DTT 5 mM para generar tampón de unión a AB031L1 y se usó inmediatamente para purificación por afinidad en Ni-NTA. Para todas las demás proteínas recombinantes, se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento dos veces en 20 ml de agua fría desionizada resuspendiendo el sedimento y repitiendo la centrifugación. El sedimento lavado se congeló a -20 °C hasta su uso posterior.

20 Se extrajo la proteína recombinante en 10-20 ml tampón de unión incubando el sedimento resuspendido durante 30 min rotando a temperatura ambiente. Para FimA con marca His, se extrajo el sedimento con tampón de unión G (GuHCl 6 M, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM (Merck, Alemania), DTT 5 mM, Tris-HCl 20 mM, pH=9,0), mientras que para AB023, AB024, AB025, AB030, CsuAB y OmpA con marca His, se extrajo el sedimento con tampón de unión U (urea 8 M, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, DTT 5 mM, Tris-HCl 20 mM, pH=8,0).

25 4.3 Purificación en Ni-NTA de proteínas recombinantes con marca his.

30 Se usaron columnas HisTrap™ HP (GE Healthcare, 17-5247-01) para la purificación por afinidad de proteínas con marca his. Se usó el aparato Avant Äkta (GE Healthcare) para efectuar la purificación a un caudal del sistema de 1 ml/min y límite de presión de columna previa de 0,5 MPa y delta de 0,3 MPa. Se equilibraron las columnas con 5 volúmenes de columna (VC) de tampón de migración. El tampón de migración consistía en los mismos componentes que el tampón de unión para cada antígeno, excepto que no estaba presente DTT. Se aplicó el tampón de unión que contenía las proteínas recombinantes extraídas a la columna y se lavó la columna con tampón de migración hasta que la señal UV de 280 nm fue estable. Se eluyeron las proteínas unidas de la columna usando 10 VC de un gradiente lineal de imidazol 20 mM a 500 mM en tampón de migración. Se recogieron las fracciones de 0,5 ml y se analizaron para determinar la presencia, pureza y cantidad de proteína recombinante mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie, respectivamente. Se combinaron las fracciones de pureza y concentración más altas de proteína recombinante y se cuantificaron por comparación de proteína recombinante valorada con un patrón de BSA valorada (0,5, 1, 2, 4, 6 µg por carril) en un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie.

40 Se precipitó FimA añadiendo etanol hasta un 90 % (v/v), se enfrió a -80 °C y se centrifugó a >14.000 fcr a 4 °C durante 30 minutos y se secó mediante Speed Vac. FimA bien fue almacenado como un sedimento o se disolvió en tampón de unión U a una concentración de 1 mg/ml a -20 °C. Todas las demás proteínas se diluyeron en tampón de migración a 1 mg/ml o 2 mg/ml y se almacenaron a -20 °C.

45 4.4 Replegamiento de OmpA

50 Se replegó OmpA de acuerdo con McConnell *et al.* (McConnell, Michael J.; Pachón, Jerónimo (2011): Protein Expression and Purification 77 (1), S. 98-103). En resumen, se diluyó 50 veces OmpA con marca his (1 ml a 1-2 mg/ml) en 50 ml de tampón de replegamiento (10 mg/ml de n-octil-β-D-glucopiranosido, NaPi 20 mM, pH 7,4) y se incubó durante la noche a 42 °C. El volumen se concentró hasta 1 mg/ml de OmpA usando dispositivos centrifugos Amicon Ultra-15 con un corte de 10 kDa (Millipore, MA, EE. UU.).

Ejemplo 5: generación de sueros de conejo policlonales y purificación de IgG de conejo

55 Se prepararon individualmente antígenos para la generación de inmunosueros de conejo. AB030 se precipitó con etanol y se resuspendió en tampón urea 1 M (urea 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH=8,0, SDS al 0,1 %) a una concentración de 1,2 mg/ml. AB031-L1 se precipitó y se disolvió el sedimento en tampón urea 1 M a una concentración de 2,5 mg/ml. Los antígenos (1,5 mg cada uno) se enviaron a Biogenes (Berlín, Alemania) donde se generaron antisueros de conejo. De cada conejo se tomó preinmunosero antes de la inmunización. Para cada antígeno, se inmunizaron dos conejos y se reforzaron 7 y 14 días después de la inmunización. En el día 28, los animales se reforzaron y se prepararon 20 ml de suero y analizaron mediante ELISA y análisis de inmunotransferencia usando proteína recombinante. Se preparó el suero total entre el día 42 y 56 después de la inmunización. Los sueros contenían timerosal al 0,02 % como conservante.

65 Se purificó la IgG total de suero mediante purificación por afinidad de proteína A usando protocolos estándar. La IgG total purificada estaba bien en tampón Tris-glicina pH=7,5, NaCl 250 mM, al timerosal al 0,02 % o en tampón

Tris-glicina pH=7,5.

Se retiró el timerosal mediante diálisis antes de los experimentos con bacterias vivas. En resumen, se sometieron a diálisis dos veces los sueros e IgG total durante 30 minutos a temperatura ambiente y una vez durante la noche a 4 °C frente a 1-2 l de PBS usando cartuchos de diálisis Slide-A-Lyzer con un corte de 10 kDa (Thermo FisherScientific, MA, EE. UU.).

Ejemplo 6: Análisis de inmunotransferencia

Se cultivaron cepas de referencia (*E coli*, *P. aeruginosa* o *A. baumannii*) o cepas aisladas clínicas de *A. baumannii* en medio LB (si no se menciona de otro modo) hasta la fase estacionaria o fase logarítmica (DO_{600} 0,3-1,2) y se centrifugaron durante 5-10 min a 4000 g. Se resuspendieron los sedimentos celulares bacterianos en agua y se lisaron con un volumen igual de 2x tampón de muestra SDS (Tris-HCl 0,1 M pH=6,8, un 4 % (p/v) SDS, un 0,2 % (p/v) de azul de bromofenol, glicerol al 20 %, DTT 0,2 M) o 2x Novex® Tris-glicina tampón de muestra SDS con agente reductor (LC2676, Invitrogen) a una concentración final equivalente a 12 DO_{600} /ml y se calentaron durante 10 minutos a 98 °C. Se diluyeron las proteínas purificadas en tampón de muestra SDS, alcanzado, por consiguiente, una concentración de 1-2 μ g por 10 μ l o una DO_{600} /ml equivalente. Por carril de un gel Novex® Tris-glicina al 4-20 % (Invitrogen), se cargaron 10 μ l de suspensión bacteriana o antígeno purificado. Se cargaron patrones de peso molecular 5-10 μ l (SeeBlue® Pre-stained, o Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard, Invitrogen) en un carril separado. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando las condiciones de ejecución 140 V durante 90 minutos (Invitrogen). En los casos en los se separaron únicamente antígenos purificados, en su lugar se usaron geles NuPAGE® Bis-Tris al 4 %-20 % (NP0322BOX, Invitrogen) y se separaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante muestras reducidas desnaturalizadas usando tampón de migración MES (Invitrogen).

Los geles bien se tiñeron con Coomassie como se describe anteriormente o se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa y se analizaron mediante tinción de Ponceau S y análisis de inmunotransferencia como se describe anteriormente para 2DE. Los antisueros de conejo se diluyeron 1:500-1:1000 y los sueros humanos 1:500. Se usaron anticuerpos secundarios, anti-IgG de conejo caprino-HRP (Sigma-Aldrich) y anti-IgG humana caprino-HRP (Invitrogen) a una dilución de 1:2000.

Los resultados de un análisis de inmunotransferencia se muestran en las figuras 3, 4, 5, 6C y 9C.

Ejemplo 7: ELISA

Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos (Nun, 439454) durante la noche a 4 °C o durante 2 h a temperatura ambiente durante cada polipéptido antigénico diluido en tampón de recubrimiento al 1 μ g/ml y 0,1 ml por pocillo. Se usó tampón de migración de urea

[urea 8 M, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0] para AB023, AB024, AB025, AB030, FimA and CsuAB con marca His como tampón de recubrimiento. Se usó PBS como tampón de recubrimiento para AB031 L1 y OmpA replegadas.

Se lavaron tres veces las placas de ELISA recubiertas con PBS-T (0,35 ml por pocillo usando lavador Skan washer 400, Skatran). Los sueros humanos o sueros de conejo se usaron como anticuerpo primario. El anticuerpo primario se diluyó en PBS-T y 0,1 ml añadido a cada pocillo. Antes de su uso como anticuerpo primario, se valoraron sueros humanos partiendo de una dilución de 1:200 y se valoraron antisueros de conejo partiendo de una dilución de 1:100 o 1:200. Se incubaron las placas de ELISA con anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente y, a continuación, se lavaron tres veces con PBS-T. Se usaron anti-IgG humana caprino-HRP (Invitrogen) o anti-IgG de conejo caprino-HRP (Sigma-Aldrich) como anticuerpos secundarios a una dilución de 1:2000 y 1:5000, respectivamente. Las placas de ELISA se lavaron de nuevo tres veces con PBS-T y se detectó HRP unida por el cambio de color de O-fenilendiamina (Fluka). Se detuvo la reacción usando HCl 1 M y se cuantificó midiendo la DO a 490 nm.

El uso de sueros humanos como anticuerpo primario permite la detección de dianas mientras que el uso de sueros de conejo demuestra la inmunogenia de las dianas.

Los resultados de ELISA se muestran en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 8: Análisis de FACS bacteriano

Se midió la DO_{600} de bacterias en fase estacionaria o bacterias en aumento exponencial. Se diluyeron las bacterias en PBS que contenían un 0,5 % (p/v) de BSA como agente bloqueante a una DO_{600} de 0,1. Se usó por reacción 0,05 ml de suspensión bacteriana y se combinó con 0,05 ml de anticuerpo primario en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo (Corning, NY, EE. UU.). Se retiró el anticuerpo no unido por dos ciclos de lavado que consistían en bacterias resuspendidas en 0,2 ml de agente bloqueante, centrifugación durante 10 minutos a 1700 g y retirada de

sobrenadante. Opcionalmente en esta fase, anticuerpo unido se fijó por incubación en un 4 % (p/v) de formaldehído/PBS durante 10 min en hielo. Si se usó fijador, las bacterias se lavaron dos veces. Se añadieron anticuerpo secundario, anti-IgG humana caprino-Alexa Fluor 488, anti-IgM humana caprino-Alexa Fluor 488 o anti-IgG de conejo caprino-FITC (Invitrogen), 0,1 ml por pocillo, a una dilución de 1:1000 y se incubó durante 30 minutos. Las bacterias se lavaron de nuevo y se analizaron usando un a FACS Calibur. El instrumento ajustado en configuración para discriminar óptimamente la población bacteriana de los restos y débil de fuertes señales fluorescente (Dispersión frontal: voltaje E01, Amp. Ganancia: 7,0, log. Dispersión lateral: voltaje 659, Amp. Ganancia: 1,0, log., FI-1: voltaje 767, Amp. Ganancia: 1,0, log.). Como control negativo, se usó únicamente tampón de lavado, ningún anticuerpo primario o preinmunsuero. Se usaron sueros de pacientes o inmunsueros de conejo como control positivo (señal fuerte). Todas las soluciones (excepto soluciones bacterianas) se filtraron de manera estéril para reducir los artefactos de FACS.

Los resultados se muestran en la figura 6A y B y en la figura 7.

Ejemplo 9: Análisis de inmunofluorescencia (AIF)

Se usaron diversos procedimientos para preparar bacterias para AIF. Se resuspendieron colonias bacterianas de placas de LBA o BHI en 50 µl de agua a densidades altas ($DO_{600} > 1$) y se extendieron sobre un pocillo de portaobjetos de vidrio de 10 pocillos (MP Biomedicals Inc., EE. UU.). Se extendieron directamente cultivos bacterianos líquidos en los portaobjetos. Se secaron al aire las extensiones y se fijaron durante 10 min con un 4 % (p/v) de formaldehído en PBS seguido de 3 etapas de lavado usando PBS. De forma alternativa, las bacterias se fijaron durante 10 min en acetona a -20 °C y se secaron al aire. Otro enfoque para preparar las bacterias para AIF fue cultivar directamente cultivos bacterianos líquidos sobre portaobjetos de vidrio (BD Biosciences, NJ, EE. UU.) para posibilitar la formación de biopelículas. Se retiró el cultivo y se fijaron las bacterias unidas al portaobjetos de vidrio como se describe anteriormente.

Se realizó AIF como sigue: se incubaron las bacterias fijadas con agente bloqueante (PBS que contenía un 1 % (p/v) de BSA) durante al menos 30 minutos. Se reemplazó el tampón por anticuerpo primario diluido en reactivo bloqueante. Se diluyeron 1:50-1:500 inmunsueros de conejo. Después de la incubación durante 1 hora las bacterias se lavaron 3-4 veces con PBS. Se incubaron anticuerpos secundarios (anti-IgG de conejo caprino-FITC (F2765, Invitrogen), diluidos en reactivo bloqueante a una dilución de 1:200-1:400, durante 45 minutos y se lavaron 3-4 veces con PBS. Se revistieron los portaobjetos con Vectashield que contenía DAPI (H-1200, Vector labs) y se sellaron con un cubreobjetos y laca de uñas. Se analizaron los portaobjetos e imágenes tomadas usando el objetivo de 100 veces con aceite de inmersión del microscopio de fluorescencia Nikon "fluonik" en el Institute of Anatomy en la Universidad de Berna, Suiza. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente.

Los resultados se muestran en la figura 8B.

Ejemplo 10: ensayo de aglutinación

Se diluyeron las bacterias en fase estacionaria en PBS a una DO_{600} de aproximadamente 3. Se concentraron las bacterias en fase logarítmica mediante centrifugación y resuspensión en PBS a una DO_{600} de aproximadamente 3. En un portaobjetos de vidrio de múltiples hojas, se mezcló 10 µl de suspensión bacteriana con un volumen igual de anticuerpo a una concentración de 0,2-1,5 mg/ml para IgG total purificada de suero de conejo. La concentración dependía de las características de los anticuerpos individuales. Los anticuerpos policlonales purificados por afinidad y monoclonales necesitan una concentración mucho más baja en comparación con la IgG total purificada de inmunsueros. El portaobjetos se agitó suavemente e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se observó aglutinación usando un Motic System Microscope (serie B1) a un aumento 10 x-40 x.

Los resultados se muestran en la figura 8A.

Ejemplo 11: ensayo de interacción para FimA directo

Se lavó dos veces un volumen de lecho de 20 µl de microesferas de proteína A (PROS® MabCapture™, Applied Biosystems®, CA, EE. UU.) en 1 ml de PBS mediante centrifugación (300 g, 1 min) y se retiró el sobrenadante. Se recubrieron las microesferas con anticuerpo incubando microesferas con 10 µg de anticuerpo en 0,2 ml de PBS durante 30 minutos y 30 rpm a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo dos veces las microesferas en 1 ml de PBS y las microesferas se contuvieron en 0,4 ml de sobrenadante de un cultivo de durante la noche en LB de *A. baumannii*. Se preparó el sobrenadante mediante centrifugación del cultivo bacteriano a >4000 g durante 5 minutos y se filtró el sobrenadante a través un filtro de 0,2 µm para jeringuillas (Nalgene n.º 194-2520). Se incubó la mezcla durante 1 h y 30 rpm a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo dos veces las microesferas en 1 ml de PBS. Finalmente, se resuspendieron las microesferas en 30 µl de tampón de lisis para geles NuPAGE® Bis-Tris al 4 %-20 % (NP0322BOX, Invitrogen) y se incubó a 98 °C durante 5 min. Se sometió a prueba la muestra para determinar la presencia de FimA natural mediante análisis de inmunotransferencia como se describe anteriormente de acuerdo con las instrucciones del fabricante para geles Bis-Tris al 4 %-20 % reducidos desnaturalizados usando tampón de migración MES (IM-8042 Version H, Invitrogen). Se usó inmunsuero de conejo frente a FimA para la detección de FimA.

Los resultados se muestran en la figura 11.

Ejemplo 12: inmunización activa y pasiva en animales

5 Los estudios de inmunización activa y pasiva se realizaron usando el modelo de neumonía por *Acinetobacter* de ratón usando como lecturas pesos corporales, puntuaciones clínicas y supervivencia en porcentaje desarrollados previamente por Eveillard *et al.*, 2010, Journal of Infection 60 (2), S. 154-161.

12.1 Inmunización activa

10 En los días 0, 14, 28, 42, se inmunizó por vía intraperitoneal cada ratón (ratones 135 C3H/HeN, 18-20 g, 6 semanas de edad. Elevage Janvier, Sarthe, Francia) con 10 µg de antígeno en 0,1 ml de un 50 % (v/v) de adyuvante de Gerbu (GERBU Biotechnik GmbH, Alemania)/PBS. Como controles negativos, se inmunizaron los ratones bien con un 50 % (v/v) de adyuvante de Gerbu/PBS o únicamente PBS.

15 En el día 49, el modelo de neumonía se inició de acuerdo con los protocolos establecidos en el laboratorio de Marie Laure Joly-Guillou y Matthieu Eveillard (Eveillard *et al.*, Journal of Infection 60 (2), S. 154-161, 2010). En resumen, los ratones se volvieron temporalmente neutropénicos inyectando ciclofosfamida (Baxter, IL, EE. UU.) mediante inyección intraperitoneal (150 mg/kg de peso corporal en 0,15 ml) en los días 4 y 3 antes de la inoculación de *A. baumannii*. Se anestesiaron los ratones mediante isoflurano junto con oxígeno puro. Se realizó la instilación endotraqueal de *A. baumannii* como se describe previamente (Joly-Guillou *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. Feb;41 (2):345-51, 1997). En resumen, se canuló la tráquea con una aguja de punta roma y se depositaron 50 µl de una suspensión bacteriana que contenía 10⁸ ufc/ml. Se confirmó el tamaño inóculo mediante cultivo cuantitativo.

25 Después de la instilación endotraqueal de los inóculos, se devolvieron los ratones a sus jaulas (día 0) y se observaron para evaluar el resultado espontáneo. Se evaluó diariamente este resultado (incluyendo día 0) y mortalidad concernida, cambios en el peso de ratón, y una puntuación clínica construida sobre la base de la movilidad de ratones (puntuación = 0 para una movilidad espontánea, puntuación = 1 cuando únicamente se observó una movilidad después de la estimulación, y puntuación = 2 para una ausencia de movilidad), el desarrollo de una conjuntivitis (puntuación = 0 en ausencia de conjuntivitis, puntuación = 1 cuando existía una conjuntivitis), y el aspecto del pelo (puntuación = 0 para pelo normal y puntuación = 1 para pelo encrespado). En conjunto, esta puntuación clínica varía de 0 para ratones normales a 4 para enfermedad grave.

Los resultados se muestran en la figura 12.

35 12.2 Inmunización pasiva

40 El modelo de neumonía se inició de acuerdo con los protocolos establecidos en el laboratorio de Marie Laure Joly-Guillou y Matthieu Eveillard (Eveillard *et al.*, Journal of Infection 60 (2), S. 154-161, 2010.). En resumen, los ratones se volvieron temporalmente neutropénicos inyectando ciclofosfamida mediante inyección intraperitoneal (150 mg/kg de peso corporal en 0,15 ml) en los días 4 y 3 antes de la inoculación de *A. baumannii*. En el día 0, 3 h antes de la inoculación de *A. baumannii*, los ratones se vacunaron pasivamente por vía intraperitoneal con bien 0,15 ml de antisuero de conejo, suero de conejo sin exposición previa o PBS. Se indujo neumonía análoga al protocolo de inmunización activa partiendo de la anestesia de los ratones. Se comprobaron la supervivencia, puntuación clínica y peso corporal análogos. Los resultados se muestran en las figuras 11 y 13.

Ejemplo 13: generación de mAb

50 Se resuspenden linfocitos de sangre periférica purificados mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque de 40 ml de muestras de sangre completa en 3 ml de medio de cultivo celular (IMDM/Ham's F12 50:50; FCS al 10%) y 3 ml de sobrenadante de cultivo celular de células de tít B-95-8 secretoras de EBV. Después de la incubación durante 3 a 15 horas a 37 °C y CO₂ al 6,5 %, se transfieren las células sueltas y adherentes después de una etapa de lavado/centrifugación en tampón de HANKS en 18 ml de medio de cultivo celular que contiene complementos +/- de 1 µg/ml de ciclosporina A. Se siembran células en placas de 96 pocillos de fondo redondo en volúmenes de 200 µl por pocillo y se cultivan durante 1 a 3 semanas hasta que se puedan identificar colonias de crecimiento rápido, líneas celulares linfoblastoides (LCL), y el medio se vuelve amarillo debido al cambio de pH. Se analizan los sobrenadantes celulares para determinar anticuerpos específicos para antígeno mediante ELISA. Luego las células productoras de anticuerpos se pasan 5 veces hasta que se obtienen los números de células suficientes para el siguiente procedimiento de fusión. Se usan 2,5x10⁵ o 1,25x10⁶ LCL y la misma cantidad de células implicadas en la fusión (por ejemplo, heteromioma de ratón-humano LA55) para una electrofusión. Se recogen las células cuando crecen exponencialmente y lavan una vez con PBS y luego con tampón de electrofusión. Se almacena el sobrenadante de LCL a 4 °C y más tarde se usa como control positivo en cribado de ELISA. Después de combinar los dos tipos de células, las células se centrifugan y el sedimento emergente se resuspende con cuidado en 200 µl de tampón de electrofusión. Para la fusión, la mezcla de células se transfiere a la cámara de Helix-Fusion de un Multiporator (Eppendorf) y se aplica el programa de fusión celular (alineamiento: 5 voltios, 30 s; pulso: 30 voltios, 30 s, n.º. de pulso: 3; postalineamiento: 5 voltios, 30 s). Luego las células se incuban a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos, se

resuspenden en 4 ml de medio de cultivo celular sin FCS y se distribuyen en 4 pocillos de una placa de 24 pocillos. Después de 3 horas de incubación a 37 °C y CO₂ al 6,5 %, se combinan las suspensiones celulares, se mezclan con 4 ml de medio de selección y se transfieren a una placa de 96 pocillos de fondo redondo (200 µl/pocillo). Después de una semana, se reemplaza el medio por medio de cultivo celular sin reactivos selectivos. Luego se cultivan las células hasta que se pueden identificar colonias de hibridoma de crecimiento rápido. A continuación, se analizan los sobrenadantes para determinar la presencia de anticuerpos específicos mediante ELISA. Los hibridomas identificados se cultivan, se reclonan mediante por cultivo celular únicos en dos tiempos y se criopreservan durante el desarrollo.

Ejemplo 14: ensayo bactericida

Se cultivaron células HL-60 (ATCC CCL-240) en IMDM (Sigma-Aldrich) o RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), conteniendo cada una un 20 % (v/v) de suero fetal bovino (FCS) inactivado con calor (40 min a 56 °C) (Biochrome, Berlín, Alemania) y GlutaMAX-1 2 mM (Gibco/ Invitrogen, EE. UU.) a 37 °C en una estufa de CO₂ al 6 %. Se mantuvieron las células a una densidad celular entre 10⁵-10⁶ células/ml pasando células cada 3-4 días en un matraz de cultivo celular limpio y reemplazando un 80 %-90 % del cultivo celular con medio recién preparado. No se cultivaron células HL-60 durante más de 4 meses.

Cuatro días con anterioridad al ensayo bactericida, se diferenciaron las células HL-60 mediante adición de 310 µl de dimetilformamida (Sigma-Aldrich, Alemania) a 8x10⁶ células HL-60 en 40 ml de medio. Se incubaron las células durante 4 días a 37 °C.

En el día del ensayo bactericida, se diluyeron 1:150 los cultivos de durante la noche de *A. baumannii* en LB en 3 ml de medio LB recién preparado y se incubaron durante 3 h a 37 °C y 200 rpm hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0,5-1,5. Se diluyó el cultivo a una DO₆₀₀ de 3,8x10⁻⁶ en IMDM precalentado a temperatura ambiente que contenía un 0,1 % (p/v) de BSA. Se diluyeron igualmente los anticuerpos o suero y los controles correspondientes en PBS. Cada anticuerpo diluido (20 µl) se combinó con 80 µl de suspensión bacteriana en un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. La concentración de anticuerpo dependía de la cepa de *A. baumannii*, suero y anticuerpo usado. Se usó anticuerpo (0,5 µg/pocillo para ATCC 19606 y CsuE KO, 5 µg/pocillo para Ruh134) de IgG total de inmunosuero de conejo (αCsuAB) o suero de conejo sin exposición previa.

Se incubaron el anticuerpo y las bacterias a 37 °C y 130 rpm durante 20 min. Se añadieron células HL-60 diferenciadas (60 µl) o medio y 20 µl de suero de cría de conejo (BRS) (Charles River Wiga GmbH, Alemania) como complemento o BRS previamente inactivado con calor incubando durante 40 min a 56 °C (HBRS) y los pocillos se incubaron a 37 °C y 130 rpm durante 120 min. Se determinaron las unidades formadoras de colonias (ufc) como sigue. Se resuspendió por completo cada pocillo y se plaquearon 10 µl de suspensión no diluida y una suspensión diluida 1:5 sobre LBA. Se incubaron las placas de LBA a 37 °C y se contaron las ufc 16-20 h más tarde.

Los resultados se muestran en la figura 9A y B.

Ejemplo 15: cartografía de péptidos/epítotos

Se realizó la cartografía de péptidos de inmunosueros de conejo y los preinmunosueros correspondientes por Pepperprint GmbH (Heidelberg, Alemania) por el análisis por micromatrices. A partir de la Seq ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16, se sintetizaron todos los posibles fragmentos peptídicos lineales que consistían en 5, 8 y 15 aminoácidos. Los fragmentos se recubrieron sobre película de copolímero PEGMA con un enlazador de dos β-alaninas y ácido aspártico. Se tiñeron las micromatrices que consistían en fragmentos peptídicos de Seq ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 por duplicado con inmunosueros específicos y preinmunosueros de conejo que se obtuvieron frente a las proteínas recombinantes correspondientes (por ejemplo, Se tiñó la micromatriz recubierta con fragmentos peptídicos de Seq ID NO 2 con preinmunosuero e inmunosuero de un conejo inmunizado con proteína recombinante de Seq ID NO 2). La generación de proteínas recombinantes se describe en el ejemplo 3 y 4. La generación de los inmunosueros se describe en el ejemplo 5. El procedimiento de tinción de anticuerpos se realizó como sigue: después de 30 min de prehinchamiento en tampón estándar (PBS, pH 7,4 + Tween 20 al 0,05 %) y 30 min en tampón de bloqueo (tampón de bloqueo Rockland B-070), se incubaron las micromatrices péptidicas con los fragmentos peptídicos recubiertos con preinmunosueros de conejo a una dilución de 1:1000 durante 16 h a 4 °C y agitando a 500 rpm. Después de lavarse en tampón estándar dos veces durante 1 min, las micromatrices se tiñeron con el anticuerpo DyLight680 anti-IgG de conejo caprino (HL) secundario a una dilución de 1:5000 durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces las micromatrices péptidicas durante 1 min con tampón estándar, se aclararon con agua destilada y se secaron en una corriente de aire. Se tomó la lectura con Odyssey Imaging System a una resolución de 21 µm e intensidades verde/rojo de 7/7. Después de la lectura, se repitió el procedimiento de tinción con el inmunosuero correspondiente partiendo de la etapa de prehinchamiento. Se omitió la incubación en tampón de bloqueo. Se compararon las intensidades de señal del preinmunosuero e inmunosuero correspondiente. Se usó un algoritmo de programa informático del analizador PepSlide[®] para calcular la mediana de la intensidad de tinción de cada péptido, promedio de duplicados y la desviación estándar calculada. Basándose en las intensidades promedio, se generó un mapa de intensidad y se identificaron conectores específicos en el mapa peptídico. Se correlacionaron mapas peptídicos y de intensidad con inspección visual de los barridos de micromatrices para identificar motivos de consenso y péptidos distintivos que interaccionaron específicamente con los inmunosueros de conejo.

Resultados Ejemplo 15

5 Para verificar la inmunogenia de fragmentos peptídicos, se realizó análisis por micromatrices como se describe en el ejemplo 15. Las Seq ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 se tradujeron en fragmentos peptídicos lineales que consistían en 5, 8 y 15 aminoácidos y se analizó la interacción con inmunosueros de conejo específicos. Mediante este enfoque para todos los inmunosueros de conejo, se identificaron los epítomos de anticuerpo con longitudes variables. La mayoría de los motivos de consenso consistían en 5 aminoácidos, mientras que otros fueron de 6, 7 u 8 aminoácidos de longitud. 10 Los preinmunosueros usados como control mostraron únicamente fondo insignificante. Basándose en el fragmento, que consiste en 8 aminoácidos, el inmunosuero específico para Seq ID NO mostró un único motivo de consenso de epítomo PVDFTVAI (SEQ ID NO: 36) y, de esta manera, muestra reactividad monoclonal.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Kenta Biotech AG
- <120> Dianas novedosas de Acinetobacter baumannii
- <130> PCT77065HV200pau
- 20 <140> todavía sin asignar
- <141> 30-11-2011
- <150> EP11191320.8<151> 2011-11-30
- 25 <160> 36
- <170> PatentIn version 3.5
- 30 <210> 1
- <211> 1254
- <212> ADN
- <213> Acinetobacter baumannii
- 35 <400> 1

```

atgaaaacgc ataaatcttt gatggtttcc tgtttatccg ttttatcaat tactcttttt      60
gttcagcatg cacaagctgc tgctgcattt gacccaaatg gttcttggat gttgggtgat      120
tggaacgggc aacgtacagc gttgcaagca caaggttatg atttttcttt tggatatacc      180
ggtgaatatg ccggtatfff agattccaaa caaacatcta cacacggtag tgcttataca      240
gggcaacttg ctttaggttc tcatttggac ctaggtaaaa ttttaggggtg gcaagataca      300
gaagctcaaa tcacattaac ttatcgtgat gggcaatcgc tttctgaaca ttctccagca      360
ttggctgggc accaaagttc tgttcaagaa gtgtggggcc gtgaacaaac ttggcgttta      420
acagatttat ggatcaagaa aaaattcctt gatcagaagt tagatgttaa agtgggccgt      480
tttggtgagg gtgaagactt taatagtttt gactgtgatt tccagaactt ggcactttgt      540
ggttcacaag tgggtaactg ggtaggcgat cagtggata actggccagt tagccaatgg      600
gcaatgctg tcaaatataa cttgcaacct gatttatata cacaagtggg tgtatatgaa      660
tataaccctg aaaacttggg acgtggcaaa ggcttcaacc taagtacaga tggttctcac      720
ggtgcaatta ttccagcaga agtagtttgg tcacctaaac taggtgtgca aagcatgcct      780
ggtgaatacc gtttaggtta ttactatagt actgccgatg ccaaagaaat tgcagattca      840
actaaaacat ctcataagca aggtgtttgg gtaactgcaa aacagaaatt attccagcca      900
gctgatcaaa ctgaccgtgg tttaacaggg tttgtgaacc tgactttcca cgactcagat      960
accaacaaag ttgataacat gcaaaatata ggcttagtct ataaaggttt gctgaatcaa     1020
cgtcctcaag atgagttggc acttgggtgt gctcgtatcc atatcaatga tgattggagc     1080
gatgttcaag ccaaagaata cgacaccgaa tataataacc agctttacta tggatttcat     1140
gccactaact ggctaactat tcgtccaaat gtgcaatatg ttcgtcatgt tgggtgcatta     1200
aaaaatggtg ataacacttg ggtaggcggg attaagttct caactgcatt ctaa           1254

```

<210> 2

<211> 417

5 <212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 2

```

Met Lys Thr His Lys Ser Leu Met Val Ser Cys Leu Ser Val Leu Ser
 1           5           10           15

```

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

Thr Asn Lys Val Asp Asn Met Gln Asn Ile Gly Leu Val Tyr Lys Gly
 325 330 335
 Leu Leu Asn Gln Arg Pro Gln Asp Glu Leu Ala Leu Gly Val Ala Arg
 340 345 350
 Ile His Ile Asn Asp Asp Trp Ser Asp Val Gln Ala Lys Glu Tyr Asp
 355 360 365
 Thr Glu Tyr Asn Thr Glu Leu Tyr Tyr Gly Ile His Ala Thr Asn Trp
 370 375 380
 Leu Thr Ile Arg Pro Asn Val Gln Tyr Val Arg His Val Gly Ala Leu
 385 390 395 400
 Lys Asn Gly Asp Asn Thr Trp Val Gly Gly Ile Lys Phe Ser Thr Ala
 405 410 415

Phe

- <210> 3
- 5 <211> 1308
- <212> ADN
- <213> Acinetobacter baumannii
- <400> 3
- 10

ES 2 568 071 T3

ttgatggatc tattccttaa tcgtaaatcg tttgttgta aaagtttagc tattacagta	60
acagctttaa tgatgagtg ggcaaatgcy gcaacttctg ataaagagga aattcgaaaa	120
cttcgtcaag aagttgaagc attaaaagca ttagttcaag aacaacgtca agtacagcaa	180
caacagcaac aagtacagca gcaacagcaa gtacagttag ctgaagtaaa agcacaacct	240
caacctgtgg cagcaccagt gtctccatta gcaggattta aatctaaagc tggcgctgat	300
gtgaaccttt atggttttgt tcgtggcgat gctaactata ttattgaagg tgcagataac	360
gactttgggt atgtaagtaa gtcagacggt aaaacacatg ataaattacg tgcgactgct	420
aaaacaacac gcctcggttt agattttaat acacctgttg gagacgacaa agttgggtgg	480
aaaatcgaag tcgattttgc tggttcaacc acagattcaa atggctcatt gcgtattcgc	540
catgcttatt taacctataa caactggttg tttgggtcaaa cgacttcaaa cttcttatct	600
aaccatgcac cagaaatgat cgacttctcg acaaacattg gtggtggtac taaacgtgta	660
cctcaagtac gctataacta caaactaggt ccaactacac aattatttgt ttctgctgaa	720
aaaggtgata gtactacttc ggtaacaggt gatagtatta agtatagcct accagcatta	780
actgctaaaa tcactcaagg ctatgcagaa ggcagaggtt ctgcttcagc tcgtgttctt	840
gtagaaaatt ataaatcaca acttgctgat gatgataaaa ctggttgggg cgttgcagtt	900
ggtactgact ttaaagtgtc tgatccttta aaactctttg ctgacgcac atatgttggtg	960
ggtgataata gttacttgta tggtagtaac tctccatacg cagtagatgg gaattctatt	1020
gagcaaatg aatttgtagc agtacaagtg ggtggaactt ataagatttt acctaactta	1080
cgttctactt tagcgtatgg tgctcagttc tctgatgatg gcactgatta tgcgagatta	1140
aatgcctctg caaatgaaaa agttcaacaa gcatggatca accttatcta tacgccagtt	1200
aaaccaattg acttaggcgt tgagtatgta aacggtaagc gtgatacatt tgaaggtaag	1260
tcttacaag ataaccgtgt tggtttaatg gctaaatata gtttctaa	1308

<210> 4

<211> 435

5 <212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 4

ES 2 568 071 T3

Met Met Asp Leu Phe Leu Asn Arg Lys Ser Phe Val Val Lys Ser Leu
1 5 10 15

Ala Ile Thr Val Thr Ala Leu Met Met Ser Gly Ala Asn Ala Ala Thr
20 25 30

Ser Asp Lys Glu Glu Ile Arg Lys Leu Arg Gln Glu Val Glu Ala Leu
35 40 45

Lys Ala Leu Val Gln Glu Gln Arg Gln Val Gln Gln Gln Gln Gln
50 55 60

Val Gln Gln Gln Gln Gln Val Gln Leu Ala Glu Val Lys Ala Gln Pro
65 70 75 80

Gln Pro Val Ala Ala Pro Val Ser Pro Leu Ala Gly Phe Lys Ser Lys
85 90 95

Ala Gly Ala Asp Val Asn Leu Tyr Gly Phe Val Arg Gly Asp Ala Asn
100 105 110

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

Asp Gly Lys Thr His Asp Lys Leu Arg Ala Thr Ala Lys Thr Thr Arg
130 135 140

Leu Gly Leu Asp Phe Asn Thr Pro Val Gly Asp Asp Lys Val Gly Gly
145 150 155 160

Lys Ile Glu Val Asp Phe Ala Gly Ser Thr Thr Asp Ser Asn Gly Ser
165 170 175

Leu Arg Ile Arg His Ala Tyr Leu Thr Tyr Asn Asn Trp Leu Phe Gly
180 185 190

Gln Thr Thr Ser Asn Phe Leu Ser Asn His Ala Pro Glu Met Ile Asp
195 200 205

Phe Ser Thr Asn Ile Gly Gly Gly Thr Lys Arg Val Pro Gln Val Arg
210 215 220

Tyr Asn Tyr Lys Leu Gly Pro Thr Thr Gln Leu Phe Val Ser Ala Glu
225 230 235 240

Lys Gly Asp Ser Thr Thr Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Lys Tyr Ser
245 250 255

Leu Pro Ala Leu Thr Ala Lys Ile Thr Gln Gly Tyr Ala Glu Gly Arg
 260 265 270
 Gly Ser Ala Ser Ala Arg Val Leu Val Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Leu
 275 280 285
 Ala Asp Asp Asp Lys Thr Gly Trp Gly Val Ala Val Gly Thr Asp Phe
 290 295 300
 Lys Val Ser Asp Pro Leu Lys Leu Phe Ala Asp Ala Ser Tyr Val Val
 305 310 315
 Gly Asp Asn Ser Tyr Leu Tyr Gly Ser Asn Ser Pro Tyr Ala Val Asp
 325 330 335
 Gly Asn Ser Ile Glu Gln Asn Glu Phe Val Ala Val Gln Val Gly Gly
 340 345 350
 Thr Tyr Lys Ile Leu Pro Asn Leu Arg Ser Thr Leu Ala Tyr Gly Ala
 355 360 365
 Gln Phe Ser Asp Asp Gly Thr Asp Tyr Ala Arg Leu Asn Ala Ser Ala
 370 375 380
 Asn Glu Lys Val Gln Gln Ala Trp Ile Asn Phe Ile Tyr Thr Pro Val
 385 390 395
 Lys Pro Ile Asp Leu Gly Val Glu Tyr Val Asn Gly Lys Arg Asp Thr
 405 410 415
 Phe Glu Gly Lys Ser Tyr Lys Asp Asn Arg Val Gly Leu Met Ala Lys
 420 425 430
 Tyr Ser Phe
 435

- <210> 5
- <211> 1443
- 5 <212> ADN
- <213> Acinetobacter baumannii
- <400> 5

ES 2 568 071 T3

atgtttttaa gaaaaaact ttcgattgca ttattagcaa ctgcttcac	ggctgttttt	60
gcacaagggt tagtgcttaa taatgatgat ttacgtaccg acttaaaactg	gttgaatcaa	120
caagtggtta ttaacatcag cacttctact tggccattaa gtggtgatga	aattcaaaga	180
gctctctctc aagctaaagt gactcatcca gcacagcaaa aagttattaa	ttcagttctc	240
aatgcattaa aggcagataa cgatacagtt aaagtgggtg cttttgctga	aactgatatc	300
aaaaatattc ctcaagcatt tggtgataac caaaaatcgc agtaccaagg	ttcattagag	360
tttaatgctg gtggtgaaaa ttgggatgca aaaatccgtg taaacgcaga	aaaagaccct	420
caaattgata gtgggcatga cgttaacggt gagggttcat atgtcgctgg	taaactctgg	480
aaccagtggc ttgttgcaag tcaaattcca acatgggtgg gacctggaca	tgatggtagc	540
ttaatccgag gcgatgcaag tcgtcctgtg tatggcgtga cggcacaag	agctgtacaa	600
aatgcttttg agacaaaatg gttatcttgg attggacctt ggcaatatca	agcttttgca	660
ggccaattag atgattataa agctgttctt catgcgaaat tattaggctt	acgtttaact	720
gcaagacctt taccctattt agaactaggt gcttctcgta ctttacaatg	gggtggtgaa	780
ggacgttctg aaagttggga ttctttgtgg aatgcaatta aagggaatga	caatgtgtat	840
gattctgatg aagatcgttc taaccaaatt gcaggttttg atgctcgttt	aaatctacaa	900
tctcttataa atgctcctgt tggatattat ggtcaatatg ttggtgaaga	tgaagctgga	960
ctacttcctt ctaaaaaaat gtatttagca ggagtcgact attcttctag	ctataataat	1020
atgccatata aactttatgc agaatgggct gataccgca ctaataatga	tgtgaagggt	1080
atctctata atcattatgt ttataaagat ggttattatc aacatggctt	cccattagga	1140
catgcatggt gtggcgatgg acaaatgtat tctgtgggtg gtgatatccg	ctttgacgtg	1200
atgaaccggt taagcggctg tgctatgggt gttaaagtta accaatctaa	cttggcaatt	1260
aataaagcat tccctaaaga tgatgaaatt aaagcgcttg atctaacttg	gacacattac	1320
atcaaacctg atcttcatt aaaaattaat ggttgggtgaa gtgattctga	cttagaaggt	1380
aatgatgcgg gtgcatcaat tggagtggaa attcctctag agcgtaaaat	gtttggtttc	1440
taa		1443

- <210> 6
- <211> 480
- 5 <212> PRT
- <213> *Acinetobacter baumannii*
- <400> 6

ES 2 568 071 T3

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

Asn Gln Trp Leu Val Ala Gly Gln Ile Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gly
 165 170 175
 His Asp Gly Ser Leu Ile Arg Gly Asp Ala Ser Arg Pro Val Tyr Gly
 180 185 190
 Val Thr Ala Gln Arg Ala Val Gln Asn Ala Phe Glu Thr Lys Trp Leu
 195 200 205
 Ser Trp Ile Gly Pro Trp Gln Tyr Gln Ala Phe Ala Gly Gln Leu Asp
 210 215 220
 Asp Tyr Lys Ala Val Pro His Ala Lys Leu Leu Gly Leu Arg Leu Thr
 225 230 235 240
 Ala Arg Pro Leu Pro Tyr Leu Glu Leu Gly Ala Ser Arg Thr Leu Gln
 245 250 255
 Trp Gly Gly Glu Gly Arg Ser Glu Ser Trp Asp Ser Leu Trp Asn Ala
 260 265 270
 Ile Lys Gly Asn Asp Asn Val Tyr Asp Ser Asp Glu Asp Arg Ser Asn
 275 280 285
 Gln Ile Ala Gly Phe Asp Ala Arg Leu Asn Leu Gln Ser Leu Ile Asn
 290 295 300
 Ala Pro Val Gly Ile Tyr Gly Gln Tyr Val Gly Glu Asp Glu Ala Gly
 305 310 315 320
 Leu Leu Pro Ser Lys Lys Met Tyr Leu Ala Gly Val Asp Tyr Ser Ser
 325 330 335
 Ser Tyr Asn Asn Met Pro Tyr Gln Leu Tyr Ala Glu Trp Ala Asp Thr
 340 345 350
 Arg Thr Asn Asn Asp Val Lys Gly Ile Ser Tyr Asn His Tyr Val Tyr
 355 360 365
 Lys Asp Gly Tyr Tyr Gln His Gly Phe Pro Leu Gly His Ala Met Gly
 370 375 380
 Gly Asp Gly Gln Met Tyr Ser Val Gly Gly Asp Ile Arg Phe Asp Val
 385 390 395 400
 Met Asn Arg Leu Ser Gly Arg Ala Met Val Val Lys Val Asn Gln Ser
 405 410 415
 Asn Leu Ala Ile Asn Lys Ala Phe Pro Lys Asp Asp Glu Ile Lys Ala
 420 425
 Leu Asp Leu Thr Trp Thr His Tyr Ile Lys Pro Asp Leu Pro Leu Lys
 435 440 445
 Ile Asn Gly Trp Val Ser Asp Ser Asp Leu Glu Gly Asn Asp Ala Gly
 450 455 460

Ala Ser Ile Gly Val Glu Ile Pro Leu Glu Arg Lys Met Phe Gly Phe
465 470 475 480

- <210> 7
- 5 <211> 2721
- <212> ADN
- <213> Acinetobacter baumannii
- <400> 7
- 10

atgccttcta	aaattaagtt	taaacagtca	actctttctc	actctatgca	tttaatctta	60
aaaatgcaga	gtatacctaa	acttatttgt	agcagcttat	tattaagttt	atgtgttact	120
ccttgttatg	ctcaaagttc	ggctgagacc	gttacaccag	aagcaaatca	gtcggtaaca	180
gattcattgg	tacaacaaac	taatacaaat	aacccaagtg	atgttccaat	taccgatgtc	240
gctactcttg	taactcaagc	acagcaacaa	caagatagct	tggctatatt	gcaacaacaa	300
gaacaatttc	cgaatcagat	tgaagaattt	aagccaatta	cgcttgataa	tcttgaagac	360
ttaccggtta	tgctgttga	tcagaatatg	gcaaatgaaa	tttatcgggt	agcagaagag	420
gcaaaaaacg	aggctcaaaa	cttcagaat	ggtagcaaa	aacaaccaga	aatggtggtg	480
aatgacgcat	cacaagcaga	attacatgaa	attaatcagg	cccctgtaa	tattgaccag	540
ctcatgcatg	agattcaatc	tgatagtaag	attgtggttg	aagccaatga	aacaggaaaa	600
actttacctg	agcttactgc	tgccgttgaa	gagccacccg	aagaaaaagg	tttctttaga	660
cgatatattca	ataaaatccg	tccacctcgg	gtaattccaa	tggagcagat	accccgtatt	720
actgctgagg	ttacgggtgc	gccagatgat	ttagctaaaa	atatcaaagg	taaattatct	780
acatttacc	aagaatcatt	tgaagatttt	aatgcagcgc	taccgcaact	taggagctta	840
agtaatcagg	ctgctcaagc	tgtaggttat	tacaatgctg	agtttcgttt	tgaaaagtta	900
agtgccagtc	gcgtacgcgt	taatgtaacg	ccaaatgaac	cagtacggat	taatgaacaa	960
aacattgaat	ttactggtgc	tggtgcaaaa	cagccacaat	ttcaggtcat	tcgtttagtt	1020
cctgaccaag	atgtaggtga	tatttttaat	catggccttt	acgaaaccac	aaaaagccga	1080
attgtcgatg	ctgcatcggg	taatggttat	tttgatgcgt	attggcgttt	acatgacgta	1140
aaagtgagcc	aacctgaaaa	taaagcggat	attaacctca	agtatgagac	tggtgagcgt	1200
tataagcttg	gtaaggttga	gtttcgcatg	agcgatccat	caaaaccatt	acctttaaat	1260
atgaatattc	ttgaaagcat	ggcaccgtgg	aaagaggggtg	atgactatgc	tttttggcgt	1320
gtaaatgttt	tagcaataaa	cctgactaac	tcacgttatt	ttaactatac	cttggtcgat	1380
tcaattaaac	ccgacceaat	tgaaaaacca	cttgagttac	cacccgattt	acaagcgttg	1440
gtcgatcagc	agaatgttga	tattgacgaa	tcgaagctgc	ttcctttaga	gcaacaacaa	1500
cttgccaaag	cagccagttt	ggcttctca	agtaaagaag	taacacaaaa	tgtggtagat	1560
gaaaaacaat	ttgccggaac	tgaaagtgta	caagccgccc	ctgcatcttt	aaaagctgca	1620
actgtacaac	atgaagaaca	agagtctgaa	caagaccggt	tacaggctca	agctcgggaa	1680
gaaaaacgta	taccagtgat	tgtgacgtta	aatgccgata	aactaaatag	tctggaaaca	1740
ggtattggtt	atggtaccga	cactggcgcc	cgtttacgta	gccaatatag	acgttcgatt	1800
gtgaataaat	acggtcattc	atgtgacgca	aacttggagc	tttcccaaat	tcgtcaatct	1860
atagatgggc	gctatagtat	tccttataaa	catccgttaa	atgattactt	taatattgtg	1920
ggtggttacg	agcgtgagac	gagggatgat	attggtccgg	atgtaagttt	acttacagaa	1980

ES 2 568 071 T3

tcggcagttt tagggggtga gcgagttatt aaaaaaccgc tcggaaactg gcaacatact	2040
attggggtac gttatcgtct cgaccgccta actcaaaagg ggaatgtgga tatctctgag	2100
ctaccagatg catttaaac tgctgcatca gagcaagaag cattattatt tagttatgag	2160
acctctaaaa cttcaagtaa tacacgctta aacccgacca aagcttttaa acaaacttat	2220
aaattagaat taggtagtga aagtttactt tcagatgccca atatggcgat tgcaactgcg	2280
ggttggagat ttatttattc tttaggtgaa aatgatgacc atcagtttgt tgggCGgtcc	2340
gatttttagtt atatttttac cgatgagttt gataaagttc catacaattt aagattcttt	2400
actggtggtg accagacaat tcgtggtttt gattataaaa gtctttcacc agaagataat	2460
ggatataaga ttggtggaca ggctctagca gtaggctctt tagaatataa ctatcaattc	2520
aaagagggtt ggcgagcagc tgtttttctt gattttggta atgcttacga taagagtttt	2580
agtaatccga cggcctatag tgtgggtggt ggtattcgtt ggaagtcccc aattggacca	2640
attcgtttag acgtggcttc tggatttctt gatgataacc atccgattcg tttgcatttc	2700
tttattggtc cacaacttta a	2721

<210> 8

<211> 906

5

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 8

ES 2 568 071 T3

Met Pro Ser Lys Ile Lys Phe Lys Gln Ser Thr Leu Ser His Ser Met
 1 5 10 15

His Leu Ile Leu Lys Met Gln Ser Ile Pro Lys Leu Ile Cys Ser Ser
 20 25 30

Leu Leu Leu Ser Leu Cys Val Thr Pro Cys Tyr Ala Gln Ser Ser Ala
 35 40 45

Glu Thr Val Thr Pro Glu Ala Asn Gln Ser Val Thr Asp Ser Leu Val
 50 55 60

Gln Gln Thr Asn Thr Asn Asn Pro Ser Asp Val Pro Ile Thr Asp Val
 65 70 75 80

Ala Thr Leu Val Thr Gln Ala Gln Gln Gln Gln Asp Ser Leu Ala Ile
 85 90 95

Leu Gln Gln Gln Glu Gln Phe Pro Asn Gln Ile Glu Glu Phe Lys Pro
 100 105 110

Ile Thr Leu Asp Asn Leu Glu Asp Leu Pro Val Met Pro Val Asp Gln
 115 120 125

Asn Met Ala Asn Glu Ile Tyr Arg Val Ala Glu Glu Ala Lys Asn Glu
 130 135 140

Ala Gln Asn Phe Gln Asn Gly Thr Gln Lys Gln Pro Glu Met Val Val
 145 150 155 160

Asn Asp Ala Ser Gln Ala Glu Leu His Glu Ile Asn Gln Ala Pro Val
 165 170 175

Asn Ile Asp Gln Leu Met His Glu Ile Gln Ser Asp Ser Lys Ile Val
 180 185 190
 Val Glu Ala Asn Glu Thr Gly Lys Thr Leu Pro Glu Leu Thr Ala Ala
 195 200 205
 Val Glu Glu Pro Pro Glu Glu Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ile Phe Asn
 210 215 220
 Lys Ile Arg Pro Pro Arg Val Ile Pro Met Glu Gln Ile Pro Arg Ile
 225 230 235 240
 Thr Ala Glu Val Thr Gly Ala Pro Asp Asp Leu Ala Lys Asn Ile Lys
 245 250 255
 Gly Lys Leu Ser Thr Phe Thr Gln Glu Ser Phe Glu Asp Phe Asn Ala
 260 265 270
 Ala Leu Pro Gln Leu Arg Ser Leu Ser Asn Gln Ala Ala Gln Ala Val
 275 280 285
 Gly Tyr Tyr Asn Ala Glu Phe Arg Phe Glu Lys Leu Ser Ala Ser Arg
 290 295 300
 Val Arg Val Asn Val Thr Pro Asn Glu Pro Val Arg Ile Asn Glu Gln
 305 310 315 320
 Asn Ile Glu Phe Thr Gly Ala Gly Ala Lys Gln Pro Gln Phe Gln Val
 325 330 335
 Ile Arg Leu Val Pro Asp Gln Asp Val Gly Asp Ile Phe Asn His Gly
 340 345 350
 Leu Tyr Glu Thr Thr Lys Ser Arg Ile Val Asp Ala Ala Ser Asp Asn
 355 360 365
 Gly Tyr Phe Asp Ala Tyr Trp Arg Leu His Asp Val Lys Val Ser Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Lys Ala Asp Ile Asn Leu Lys Tyr Glu Thr Gly Glu Arg
 385 390 395 400
 Tyr Lys Leu Gly Lys Val Glu Phe Arg Met Ser Asp Pro Ser Lys Pro
 405 410 415
 Leu Pro Leu Asn Met Asn Ile Leu Glu Ser Met Ala Pro Trp Lys Glu
 420 425 430
 Gly Asp Asp Tyr Ala Phe Trp Arg Val Asn Val Leu Ala Asn Asn Leu
 435 440 445
 Thr Asn Ser Arg Tyr Phe Asn Tyr Thr Leu Val Asp Ser Ile Lys Pro
 450 455 460
 Asp Pro Ile Glu Lys Pro Leu Glu Leu Pro Pro Asp Leu Gln Ala Leu
 465 470 475 480

Val Asp Gln Gln Asn Val Asp Ile Asp Glu Ser Lys Leu Leu Pro Leu
 485 490 495
 Glu Gln Gln Gln Leu Ala Lys Ala Arg Gln Leu Ala Ser Ser Ser Lys
 500 505 510
 Glu Val Thr Gln Asn Val Val Asp Glu Lys Gln Phe Ala Gly Thr Glu
 515 520 525
 Ser Val Gln Ala Ala Pro Ala Ser Leu Lys Ala Ala Thr Val Gln His
 530 535 540
 Glu Glu Gln Glu Ser Glu Gln Asp Arg Leu Gln Ala Gln Ala Arg Glu
 545 550 555
 Glu Lys Arg Ile Pro Val Ile Val Thr Leu Asn Ala Asp Lys Leu Asn
 565 570 575
 Ser Leu Glu Thr Gly Ile Gly Tyr Gly Thr Asp Thr Gly Ala Arg Leu
 580 585 590
 Arg Ser Gln Tyr Arg Arg Ser Ile Val Asn Lys Tyr Gly His Ser Phe
 595 600 605
 Asp Ala Asn Leu Glu Leu Ser Gln Ile Arg Gln Ser Ile Asp Gly Arg
 610 615 620
 Tyr Ser Ile Pro Tyr Lys His Pro Leu Asn Asp Tyr Phe Asn Ile Val
 625 630 635 640
 Gly Gly Tyr Glu Arg Glu Thr Arg Asp Asp Ile Gly Pro Asp Val Ser
 645 650 655
 Leu Leu Thr Glu Ser Ala Val Leu Gly Gly Glu Arg Val Ile Lys Lys
 660 665 670
 Pro Leu Gly Asn Trp Gln His Thr Ile Gly Val Arg Tyr Arg Leu Asp
 675 680 685
 Arg Leu Thr Gln Lys Gly Asn Val Asp Ile Ser Glu Leu Pro Asp Ala
 690 695 700
 Phe Lys Thr Ala Ala Ser Glu Gln Glu Ala Leu Leu Phe Ser Tyr Glu
 705 710 715 720
 Thr Ser Lys Thr Ser Ser Asn Thr Arg Leu Asn Pro Thr Lys Ala Phe
 725 730 735
 Lys Gln Thr Tyr Lys Leu Glu Leu Gly Ser Glu Ser Leu Leu Ser Asp
 740 745 750
 Ala Asn Met Ala Ile Ala Thr Ala Gly Trp Arg Phe Ile Tyr Ser Leu
 755 760 765
 Gly Glu Asn Asp Asp His Gln Phe Val Gly Arg Ser Asp Phe Ser Tyr
 770 775 780

ES 2 568 071 T3

Ile Phe Thr Asp Glu Phe Asp Lys Val Pro Tyr Asn Leu Arg Phe Phe
 785 790 795 800

Thr Gly Gly Asp Gln Thr Ile Arg Gly Phe Asp Tyr Lys Ser Leu Ser
 805 810 815

Pro Glu Asp Asn Gly Tyr Lys Ile Gly Gly Gln Ala Leu Ala Val Gly
 820 825 830

Ser Leu Glu Tyr Asn Tyr Gln Phe Lys Glu Gly Trp Arg Ala Ala Val
 835 840 845

Phe Ser Asp Phe Gly Asn Ala Tyr Asp Lys Ser Phe Ser Asn Pro Thr
 850 855 860

Ala Tyr Ser Val Gly Val Gly Ile Arg Trp Lys Ser Pro Ile Gly Pro
 865 870 875 880

Ile Arg Leu Asp Val Ala Ser Gly Ile Ser Asp Asp Asn His Pro Ile
 885 890 895

Arg Leu His Phe Phe Ile Gly Pro Gln Leu
 900 905

- <210> 9
- <211> 1500
- 5 <212> ADN
- <213> Acinetobacter baumannii
- <400> 9

ttgttatata	aatgccaac	acatcaatat	cgacagtcta	aacgtccttt	tttgtttaaa	60
cccaattacc	ttgcgttgg	attgggagta	ttaattgcaa	cgctattta	tgcgcaaagt	120
ttaagttatg	ctgaagcaga	acaacaggct	ttaaaaagct	catacagcac	tcaagccaac	180
caagcattac	aacaagcctc	tcagttagaa	gccgaagcgg	taaaaggttt	aggactcccc	240
agagttgatt	taaatgtgag	agcatatgct	tttcatagtg	aaacagatgt	acccttaggc	300
tcttttaaac	aaaaacttga	aatgattta	agccaaggac	tcaatgataa	attatcccag	360
tggaacaatg	tcattccatc	agatgtttta	ggtcaagttc	aagaaggctc	aaaccaaatc	420
atacatgacg	gtataaacg	ttttcctgac	tacgctaatt	tgactgtaga	agaccaagta	480
gtccgaccat	ctatttcagt	ggtgatgccg	ctctacacag	ggggcttaac	aactagtgcc	540
aaaaaaaaatag	ccaacattca	ggctcaacgc	tccgagcttt	caagccaaca	acaacaagat	600
atccagcgct	tcgaagtcgt	acaaagttat	tttaatgtgc	aattacaaca	acaactggtc	660
gcaagtagtc	tatttaactt	taatgcaatg	caaaaacatt	acagcaatgc	gttaaagctc	720
gaacagcaag	gttttattag	taaagggcaa	cgatgacagt	ttgaagttgc	tcgtaacaat	780
gccgaacgaa	ctctacaaaa	tgcgcaggca	aatctgaatg	ctagccaatt	taatttaaac	840
aatcttttgc	accagcaaaa	taatgctgat	ttaagtactc	ctctttttgt	aaatactgtt	900
cgtagccaat	cgttagaatc	tcttttaagc	agttactctc	aaaaatctag	ccttgtgcaa	960
aaaatgcagt	tagacactca	attggcaaat	gcaaatattc	aggctcaaca	agcagcaaaa	1020
aaaccgagtc	ttttcgcttt	tggtgagtat	tcactcgatg	aaaatgaaaa	ctggattgta	1080
ggtgttatgg	caaaatacaa	tctgttttct	ggcgtagata	aaaataagaa	tattcatgct	1140
gccgagttaa	aacgttatgc	ttcagaactc	atgactgaac	gaactaaca	agagattgaa	1200
gcattattga	ataagtctta	taacgagctc	aattcagcac	agcaaagtca	tacgctattg	1260
caaaggaata	tcagcgcagc	tcaagaaaac	ctacgtattc	aggaactttc	tttccgagaa	1320
ggcatgggta	cagcgactca	agtgatcgat	gcacaaaatg	cattaagtgc	tttaaaaaca	1380
gaaatggctt	taaatgctta	taaatatgtc	atgtcgctcg	caacgctatt	acaagccat	1440
ggttctatgg	accagtttaa	agcttatgtg	actcaaccac	acactgacta	tatccgctaa	1500

<210> 10

<211> 499

5 <212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 10

ES 2 568 071 T3

Met Leu Tyr Lys Met Pro Thr His Gln Tyr Arg Gln Ser Lys Arg Pro
1 5 10 15

Phe Leu Phe Lys Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Val Leu Gly Val Leu Ile
20 25 30

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

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

Gln Ala Ser Gln Leu Glu Ala Glu Ala Val Lys Gly Leu Gly Leu Pro
65 70 75 80

Arg Val Asp Leu Asn Val Arg Ala Tyr Ala Phe His Ser Glu Thr Asp
85 90 95

Val Pro Leu Gly Ser Phe Lys Gln Lys Leu Glu Asn Asp Leu Ser Gln
100 105 110

Gly Leu Asn Asp Lys Leu Ser Gln Trp Asn Asn Val Ile Pro Ser Asp
115 120 125

Val Leu Gly Gln Val Gln Glu Gly Ser Asn Gln Ile Ile His Asp Gly
130 135 140

Ile Asn Arg Phe Pro Asp Tyr Ala Asn Leu Thr Val Glu Asp Gln Val
145 150 155 160

Val Arg Pro Ser Ile Ser Val Val Met Pro Leu Tyr Thr Gly Gly Leu
165 170 175

Thr Thr Ser Ala Lys Lys Ile Ala Asn Ile Gln Ala Gln Arg Ser Glu
180 185 190

Leu Ser Ser Gln Gln Gln Gln Asp Ile Gln Arg Phe Glu Val Val Gln
195 200 205

Ser Tyr Phe Asn Val Gln Leu Gln Gln Gln Leu Val Ala Ser Ser Leu
210 215 220

Phe Asn Phe Asn Ala Met Gln Lys His Tyr Ser Asn Ala Leu Lys Leu
 225 230 235 240 245
 Glu Gln Gln Gly Phe Ile Ser Lys Gly Gln Arg Met Gln Phe Glu Val
 245 250 255
 Ala Arg Asn Asn Ala Glu Arg Thr Leu Gln Asn Ala Gln Ala Asn Leu
 260 265 270
 Asn Ala Ser Gln Phe Asn Leu Asn Asn Leu Leu His Gln Gln Asn Asn
 275 280 285
 Ala Asp Leu Ser Thr Pro Leu Phe Val Asn Thr Val Arg Ser Gln Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ser Leu Leu Ser Ser Tyr Ser Gln Lys Ser Ser Leu Val Gln
 305 310 315 320
 Lys Met Gln Leu Asp Thr Gln Leu Ala Asn Ala Asn Ile Gln Ala Gln
 325 330 335
 Gln Ala Ala Lys Lys Pro Ser Leu Phe Ala Phe Gly Glu Tyr Ser Leu
 340 345 350
 Asp Glu Asn Glu Asn Trp Ile Val Gly Val Met Ala Lys Tyr Asn Leu
 355 360 365
 Phe Ser Gly Val Asp Lys Asn Lys Asn Ile His Ala Ala Glu Leu Lys
 370 375 380
 Arg Tyr Ala Ser Glu Leu Met Thr Glu Arg Thr Lys Gln Glu Ile Glu
 385 390 395 400
 Ala Leu Leu Asn Lys Ser Tyr Asn Glu Leu Asn Ser Ala Gln Gln Ser
 405 410 415
 His Thr Leu Leu Gln Arg Asn Ile Ser Ala Ala Gln Glu Asn Leu Arg
 420 425 430
 Ile Gln Glu Leu Ser Phe Arg Glu Gly Met Gly Thr Ala Thr Gln Val
 435 440 445
 Ile Asp Ala Gln Asn Ala Leu Ser Ala Leu Lys Thr Glu Met Ala Leu
 450 455 460
 Asn Ala Tyr Lys Tyr Val Met Ser Leu Ala Thr Leu Leu Gln Ser His
 465 470 475 480
 Gly Ser Met Asp Gln Phe Lys Ala Tyr Val Thr Gln Pro His Thr Asp
 485 490 495
 Tyr Ile Arg

<210> 11
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

<400> 11

```

atgaaaaaac ttgctttgat cgctgctctt tCGgttgtag ggattgcgaa tgctcaagct      60
gctgatggta caattacaat taatggttta gttacagaca aaacttgta catcgttact      120
cctgctggta aagatttcac agtgactctt cctactgttt ctaaacaac tttagctggt      180
gctgggggatg ttgctggccg tactcctttc caaatcaact tagctaactg ttcacaaggt      240
aaagtagcta cttactttga accaggtgca actgttgact tcaatactgg tcgtttactt      300
aaccaagacg ctactggcgc taaaaacggt aacgttcaac ttttaggtag caacaataac      360
ttcatccag  tacttgctgc tggtgcaaac ggtgctcaag ctaactctca atggggtgac      420
gtagctgaag gtgcaagtgc tgacctaac tactatgctg aatactatgc aactgggtct      480
tctactgctg gtaaagtaac tacttctggt caatacacia ttatctatca ataa          534
    
```

5

<210> 12
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter baumannii

10

<400> 12

```

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

ES 2 568 071 T3

<210> 13
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

5

<400> 13

```

atgaatatga aaaacattca gaaatcactt cttgcagcat taatagttgc tggttatgcg      60
gtaaatactc aagcagctgt tactggtcag gttgacgtta aattaaatat ctcaacaggc      120
tgtactgtag gtggtagtca aactgaagga aatatgaaca agtttggtac tttaaatttt      180
ggtaaaactt ccggtacttg gaacaacgta ttaacagctg aagttgcttc agcagcaaca      240
ggtggcaata tttctgtgac ttgtgacgga acagatcctg ttgattttac agtcgcaatt      300
gacggtggtg aacgtacaga ccgcacttta aaaaatactg cttctgctga tgtagttgca      360
tataacgttt atcgtgatgc tgcacgtaca aacctttatg ttgtaaacca accacaacag      420
ttcactacag taagtggcca agctactgcc gtaccaatth tcggtgcaat tgctccaaac      480
acaggtacac caaaagcaca aggcgattat aaagatactc tattagtcac tgtaaatttc      540
taa                                                                                   543
    
```

10 <210> 14
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter baumannii

15 <400> 14

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

- <210> 15
- <211> 1071
- 5 <212> ADN
- <213> Acinetobacter baumannii
- <400> 15

```

atgaaattga gtcgtattgc acttgctact atgcttggtg ctgctccatt agctgctgct      60
aatgctggcg taacagttac tccattattg cttggttaca cttccaaga cagccaacac      120
aacaatggcg gtaaagatgg taacttaact aacggctcctg agttacaaga cgatttattc      180
gttggcgcag ctcttggtat cgagttaact ccatggttag gtttcgaagc tgaatataac      240
caagttaaag gcgacgtaga cggcgcttct gctggtgctg aatataaaca aaaacaaatc      300
aacggtaact tctatgttac ttctgattta attactaaaa actacgacag caaaatcaag      360
ccgtacgtat tattaggtgc tggtcactat aaatacgact ttgatggcgt aaaccgtggt      420
acacgtggta cttctgaaga aggtacttta ggtaacgctg gtgttggtgc tttctggcgc      480
ttaaacgacg ctttatctct tcgtactgaa gctcgtgcta cttataatgc tgatgaagag      540
ttctggaact atacagctct tgctggctta aacgtagttc ttggtgggtca cttgaagcct      600
gctgctcctg tagtagaagt tgctccagtt gaaccaactc cagttgctcc acaaccacaa      660
gagttaactg aagaccttaa catggaactt cgtgtgttct ttgatactaa caaatcaaac      720
atcaaagacc aatacaagcc agaaattgct aaagttgctg aaaaattatc tgaataccct      780
aacgctactg cacgtatcga aggtcacaca gataacactg gtccacgtaa gttgaacgaa      840
cgtttatctt tagctcgtgc taactctggt aaatcagctc ttgtaaacga atacaacggt      900
gatgcttctc gtttgtctac tcaaggtttc gcttgggatc aaccgattgc tgacaacaaa      960
actaaagaag gtcgtgctat gaaccgtcgt gtattcgcga caatcactgg tagccgtact     1020
gtagtagttc aacctgggtca agaagcggca gctcctgcag cagctcaata a           1071
    
```

<210> 16
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter baumannii

5

<400> 16

```

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

10

ES 2 568 071 T3

Gln Val Lys Gly Asp Val Asp Gly Ala Ser Ala Gly Ala Glu Tyr Lys
85 90 95

Gln Lys Gln Ile Asn Gly Asn Phe Tyr Val Thr Ser Asp Leu Ile Thr
100 105 110

Lys Asn Tyr Asp Ser Lys Ile Lys Pro Tyr Val Leu Leu Gly Ala Gly
115 120 125

His Tyr Lys Tyr Asp Phe Asp Gly Val Asn Arg Gly Thr Arg Gly Thr
130 135 140

Ser Glu Glu Gly Thr Leu Gly Asn Ala Gly Val Gly Ala Phe Trp Arg
145 150 155 160

Leu Asn Asp Ala Leu Ser Leu Arg Thr Glu Ala Arg Ala Thr Tyr Asn
165 170 175

Ala Asp Glu Glu Phe Trp Asn Tyr Thr Ala Leu Ala Gly Leu Asn Val
180 185 190

Val Leu Gly Gly His Leu Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Glu Val Ala
195 200 205

Pro Val Glu Pro Thr Pro Val Ala Pro Gln Pro Gln Glu Leu Thr Glu
210 215 220

Asp Leu Asn Met Glu Leu Arg Val Phe Phe Asp Thr Asn Lys Ser Asn
225 230 235 240

Ile Lys Asp Gln Tyr Lys Pro Glu Ile Ala Lys Val Ala Glu Lys Leu
245 250 255

Ser Glu Tyr Pro Asn Ala Thr Ala Arg Ile Glu Gly His Thr Asp Asn
260 265 270

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

Ser Val Lys Ser Ala Leu Val Asn Glu Tyr Asn Val Asp Ala Ser Arg
290 295 300

Leu Ser Thr Gln Gly Phe Ala Trp Asp Gln Pro Ile Ala Asp Asn Lys
305 310 315 320

Thr Lys Glu Gly Arg Ala Met Asn Arg Arg Val Phe Ala Thr Ile Thr
325 330 335

Gly Ser Arg Thr Val Val Val Gln Pro Gly Gln Glu Ala Ala Ala Pro
340 345 350

Ala Ala Ala Gln
355

<210> 17
<211> 27

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 17
 ggcaggatcc gctgctgcat ttgacct 27

 10 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 18
 cggaatgtcg acttagaatg cagttg 26

 20 <210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 19
 30 ggcaggatcc gcaactctg ataaagag 28

 <210> 20
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 40 <400> 20
 caaagtcgac ttagaagcta tatttagcc 29

 <210> 21
 <211> 35
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 50 <400> 21
 tcgcgatcc caaggttag tgcttaataa tgatg 35

 <210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> cebador

<400> 22
 cgacaagctt agaaaccaaa cattttacgc tc 32

5 <210> 23
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 23
 ctgtggatc ccaaagttcg gctgagacc 29

15 <210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 24
 aaagtgact taaagttg gaccaataaa gaaatg 36

25 <210> 25
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 25
 aaaggatcca gagcatatgc tttcatagt g 31

35 <210> 26
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

45 <400> 26
 aaagtogact taagatggtc ggactacttg gtcttct 37

50 <210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador

<400> 27
 ggacgaggat ccgctgatgg tacaattaca 30

60 <210> 28
 <211> 30
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 28
 aactaagctt tcaacccatt gattgagcac 30

 10 <210> 29
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 29
 aatactggat ccgctgttac tggtcag 27

 20 <210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 30
 aactaagctt ttagaaattt acagtgacta atagag 36

 30 <210> 31

 <211> 28
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 40 <400> 31
 ctgctgaatt cggcgtaaca gttactcc 28

 <210> 32
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 50 <400> 32
 caagaaagct tattattgag 20

 <210> 33
 55 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> cebador

 <400> 33

ES 2 568 071 T3

taatacgact cactatagg 19

5 <210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 34
tgctagttat tgctcagcgg 20

15 <210> 35
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 35
cgggtgcgcc agatgattta gc 22

25 <210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii

30 <220>
<223> epítipo

<400> 36

Pro Val Asp Phe Thr Val Ala Ile
5

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende al menos un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
- a) un polinucleótido que tiene la secuencia de ácidos nucleicos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15;
- 10 b) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por el polinucleótido de (a), en el que dicho fragmento tiene actividad inmunoestimuladora;
- c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y que tiene actividad inmunoestimuladora;
- 15 d) un polinucleótido que es al menos un 80 % idéntico al polinucleótido de (a), y que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora;
- e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora;
- 20 f) un polinucleótido que es complementario a la longitud completa de un polinucleótido de cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora; y
- 25 en la que dicho polipéptido deriva del género *Acinetobacter*.
2. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico es ADN genómico.
- 30 3. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho polipéptido deriva de la especie *Acinetobacter baumannii*.
4. La composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición de vacuna comprende adicionalmente un adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 5. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico que consiste en una secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16; o un fragmento funcional, que tiene actividad inmunoestimuladora.
- 40 6. Una célula huésped que comprende el vector y/o la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que une específicamente el polipéptido codificado por el ácido nucleico de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede inducir una función efectora hacia *Acinetobacter baumannii*.
- 45 8. El anticuerpo de codificado por el ácido nucleico la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es policlonal.
9. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es monoclonal.
- 50 10. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que une específicamente el motivo de consenso de epítipo PVDFTVAI mostrado en SEQ ID NO: 36.
11. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de codificado por el ácido nucleico reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede inducir una función efectora hacia *Acinetobacter baumannii*.
- 55 12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el anticuerpo es humano.
13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que el anticuerpo se modifica de manera N terminal, interna y/o C terminal.
- 60 14. El anticuerpo de codificado por el ácido nucleico la reivindicación 13, en el que la modificación se selecciona de al menos una de oligomerización y conjugación a un fármaco y/o un marcador.
- 65 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el anticuerpo se produce a partir de un

linfocito B humano o un hibridoma obtenido por fusión de dicho linfocito B humano con una célula de mieloma o heteromiéloma.

- 5 16. Un hibridoma que puede producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.
17. Un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 o 15.
- 10 18. Un vector que comprende el ácido nucleico de codificado por el ácido nucleico reivindicación 17.
19. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 18 y/o el ácido nucleico de codificado por el ácido nucleico reivindicación 17.
- 15 20. Un procedimiento para producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende cultivar el hibridoma de codificado por el ácido nucleico la reivindicación 16 en condiciones que permiten la secreción de un anticuerpo, y opcionalmente purificar el anticuerpo del sobrenadante de cultivo.
- 20 21. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 10 u 11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
22. Una composición de diagnóstico que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 10 u 11 para detectar una infección bacteriana en un paciente.
- 25 23. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana en un mamífero.
24. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el mamífero es humano.
- 30 25. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 23 o 24, en el que la infección está provocada por *Acinetobacter baumannii*.
26. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en el que la infección es adquirida en el hospital.
- 35 27. Un polipéptido para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana provocada por *Acinetobacter* en un mamífero, en el que el polipéptido se codifica por una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
- 40 a) un polinucleótido que tiene la secuencia de ácidos nucleicos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15;
- b) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por el polinucleótido de (a), en el que dicho fragmento tiene actividad inmunoestimuladora;
- 45 c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y que tiene actividad inmunoestimuladora;
- 50 d) un polinucleótido que es al menos un 80 % idéntico al polinucleótido de (a), y que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora;
- e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora; y
- 55 f) un polinucleótido que es el complemento de la longitud completa de un polinucleótido de cualquiera de (a) a (d) que codifica un polipéptido que tiene actividad inmunoestimuladora.
28. El polipéptido para su uso de acuerdo con codificado por el ácido nucleico reivindicación 27, en el que el mamífero es humano.
- 60 29. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en el que la infección está provocada por *Acinetobacter baumannii*.
- 65 30. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que la infección es adquirida en el hospital.

31. La composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el polipéptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 27 a 30, que comprende adicionalmente un vehículo de administración.

5 32. La composición de vacuna o el polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 31, en la que el vehículo de administración es un virosoma.

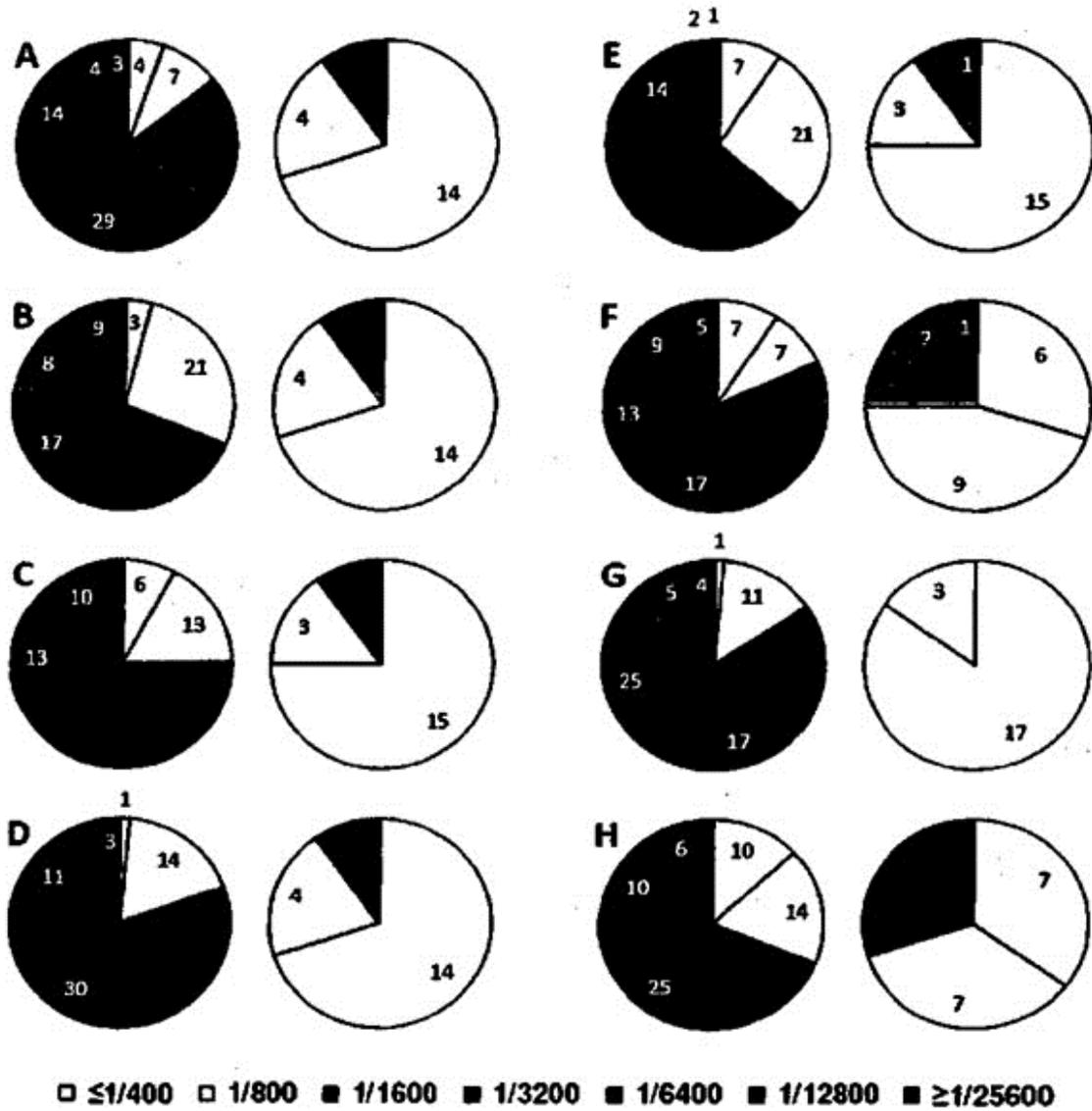


Figura 1: valores de IgG en sueros de pacientes con *A. baumannii* convalecientes

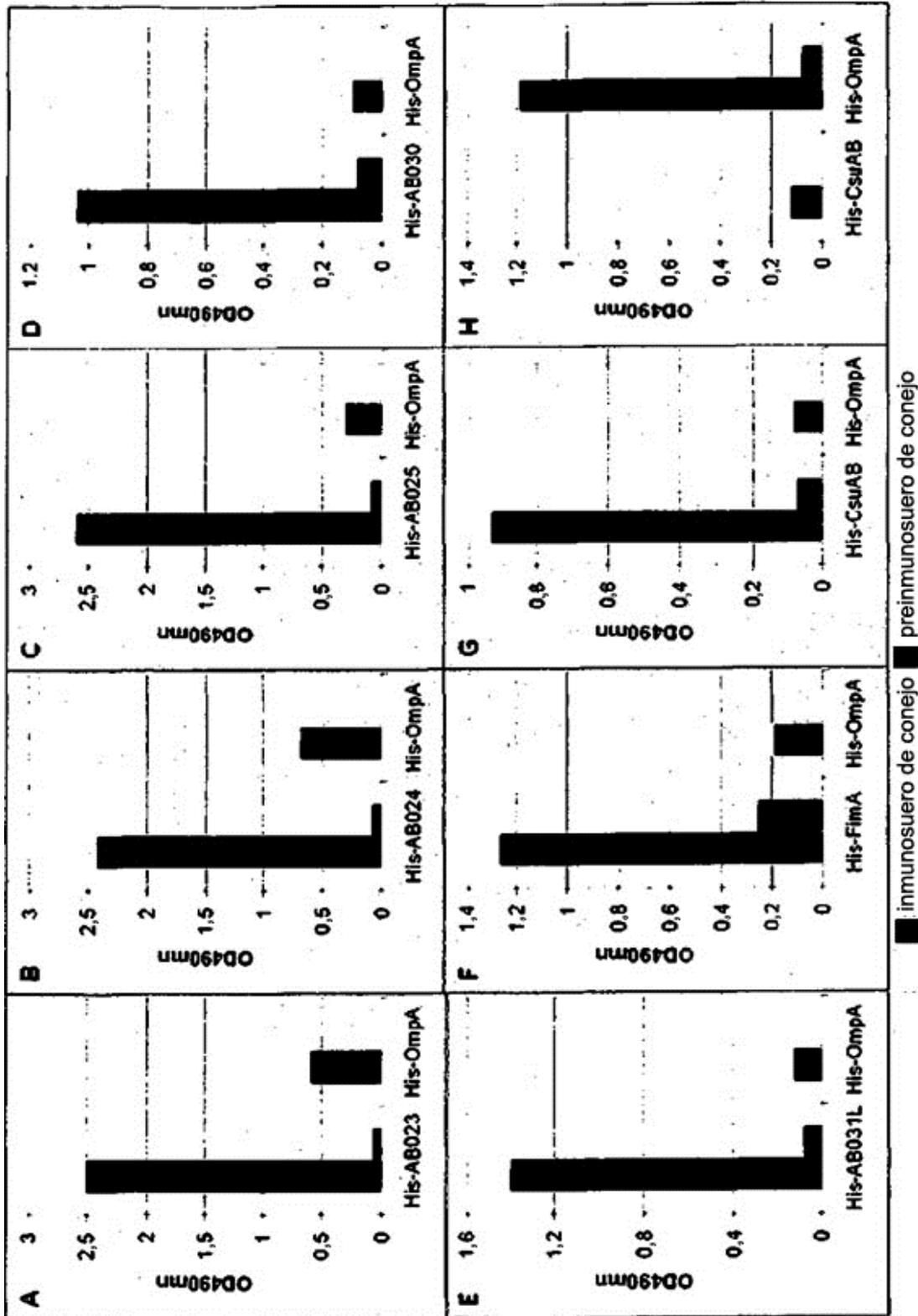


Figura 2: ELISA de sueros de conejo

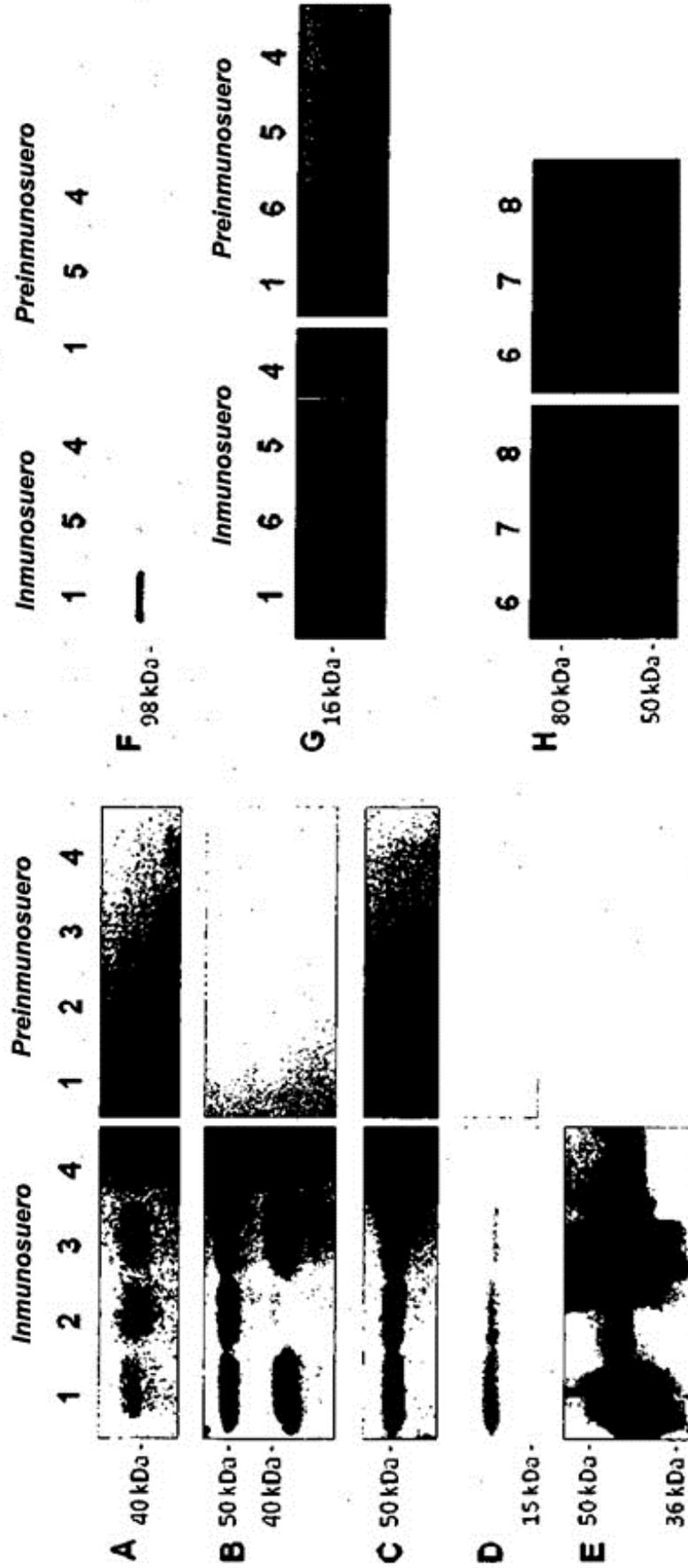


Figura 3: análisis de inmunotransferencia

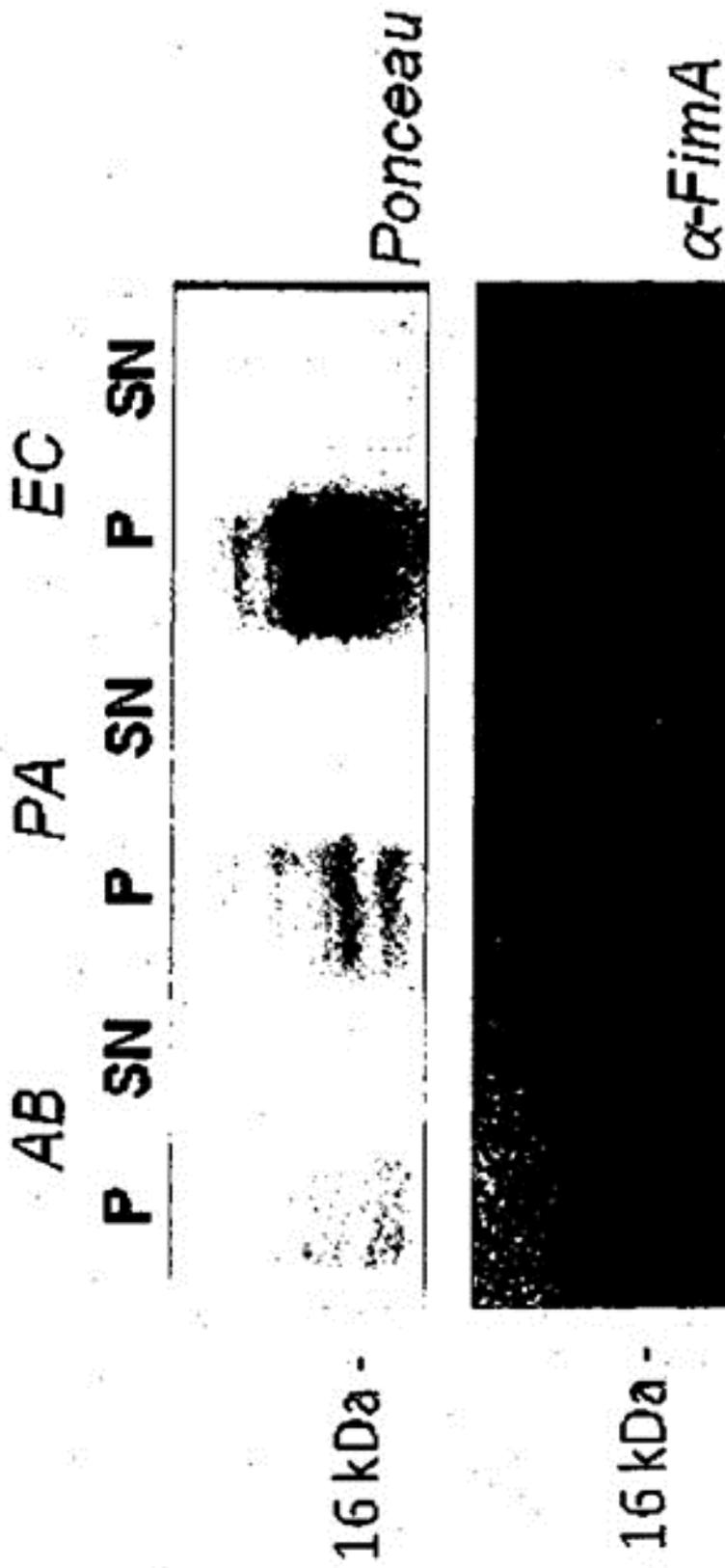


Figura 4: análisis de inmunotransferencia

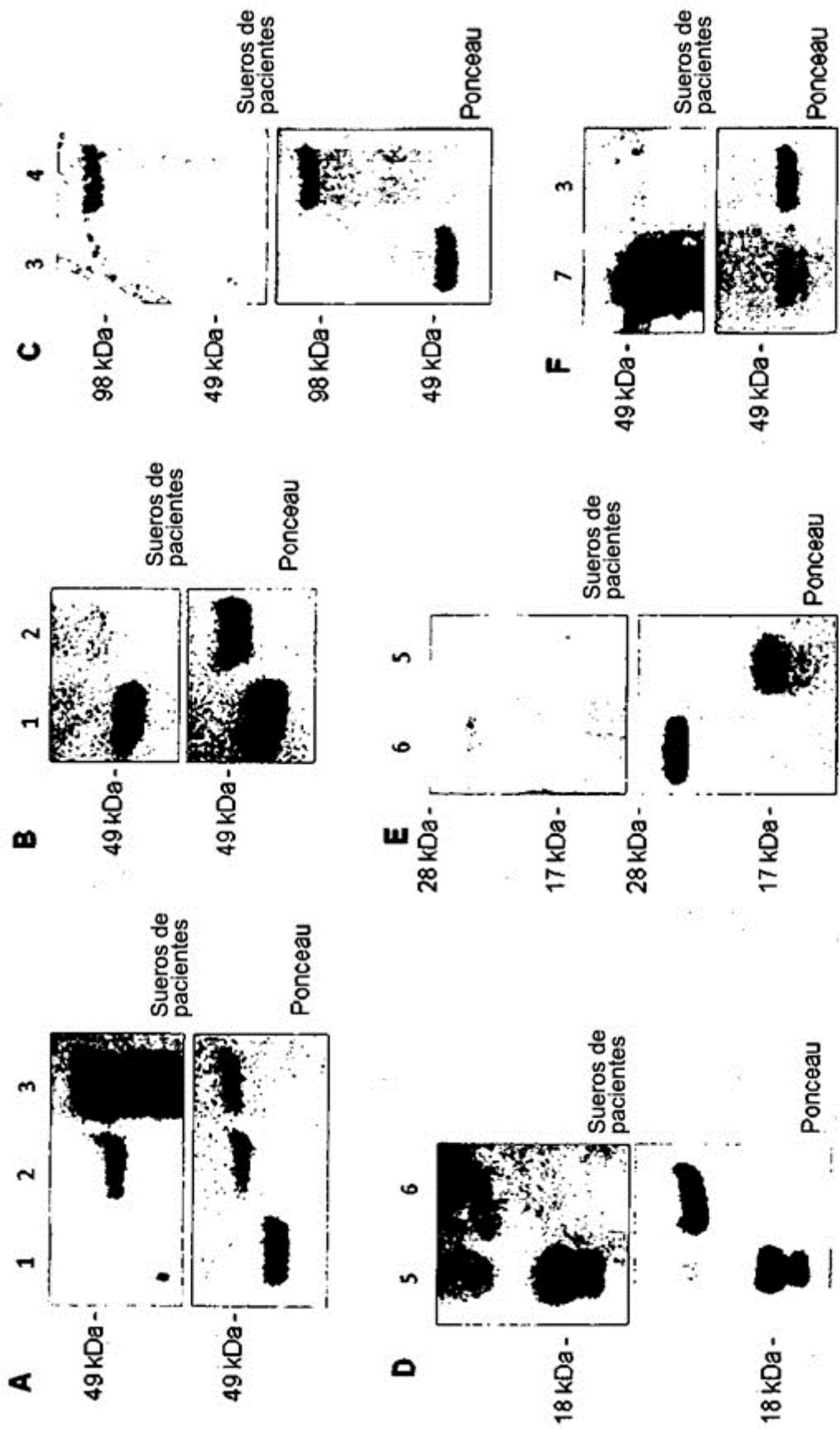


Figura 5: análisis de inmunotransferencia

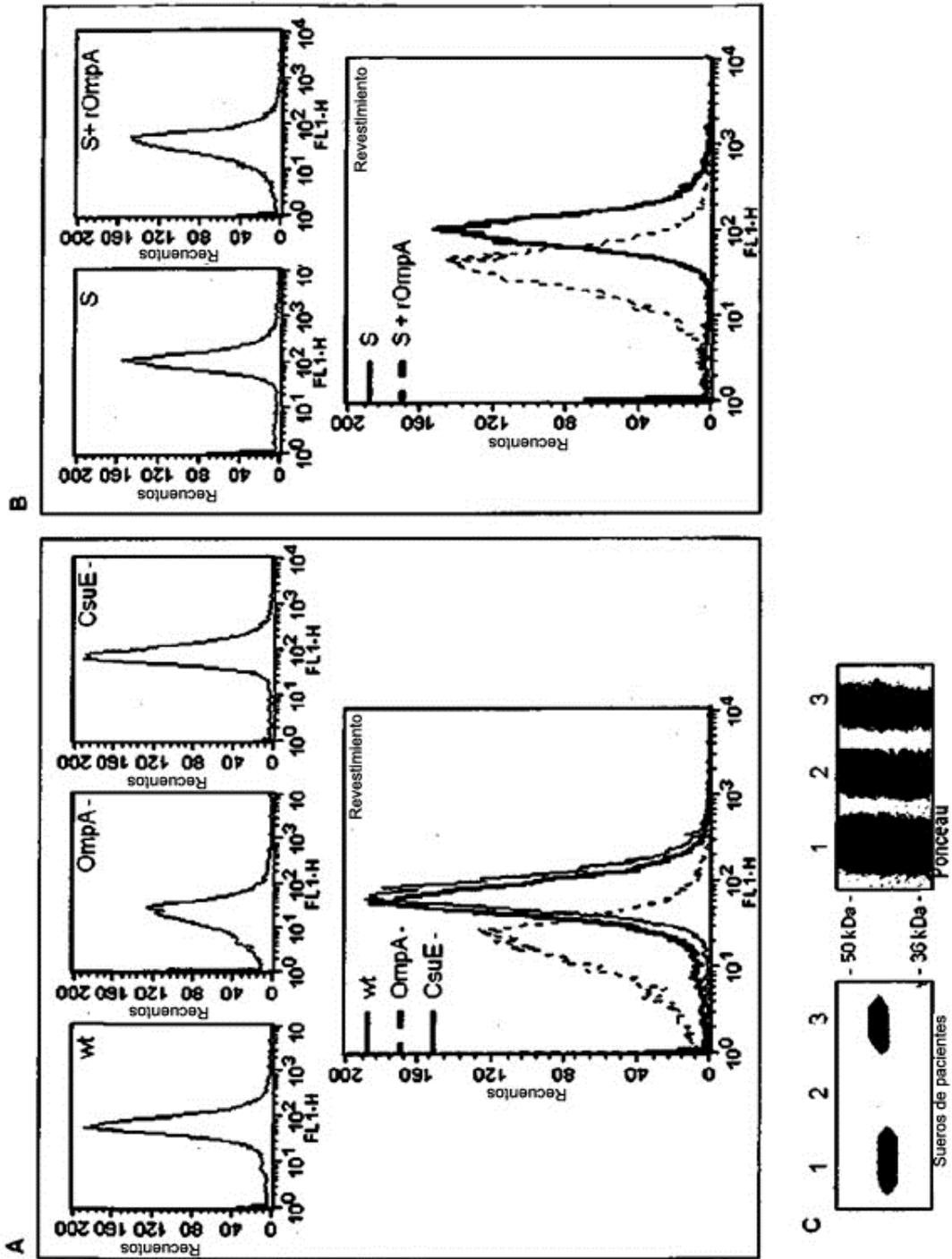


Figura 6: análisis de FACS

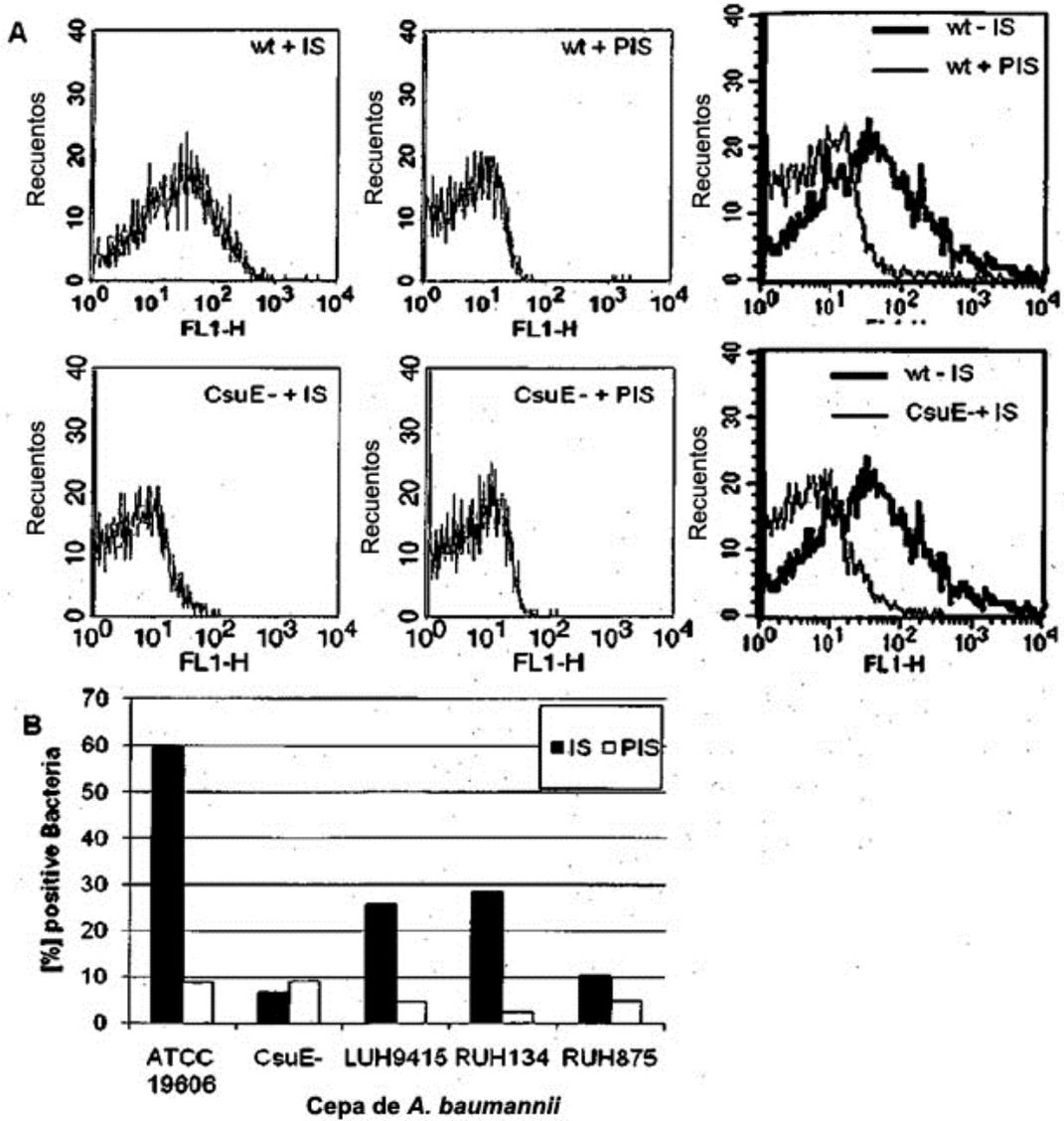


Figura 7: análisis de FACS

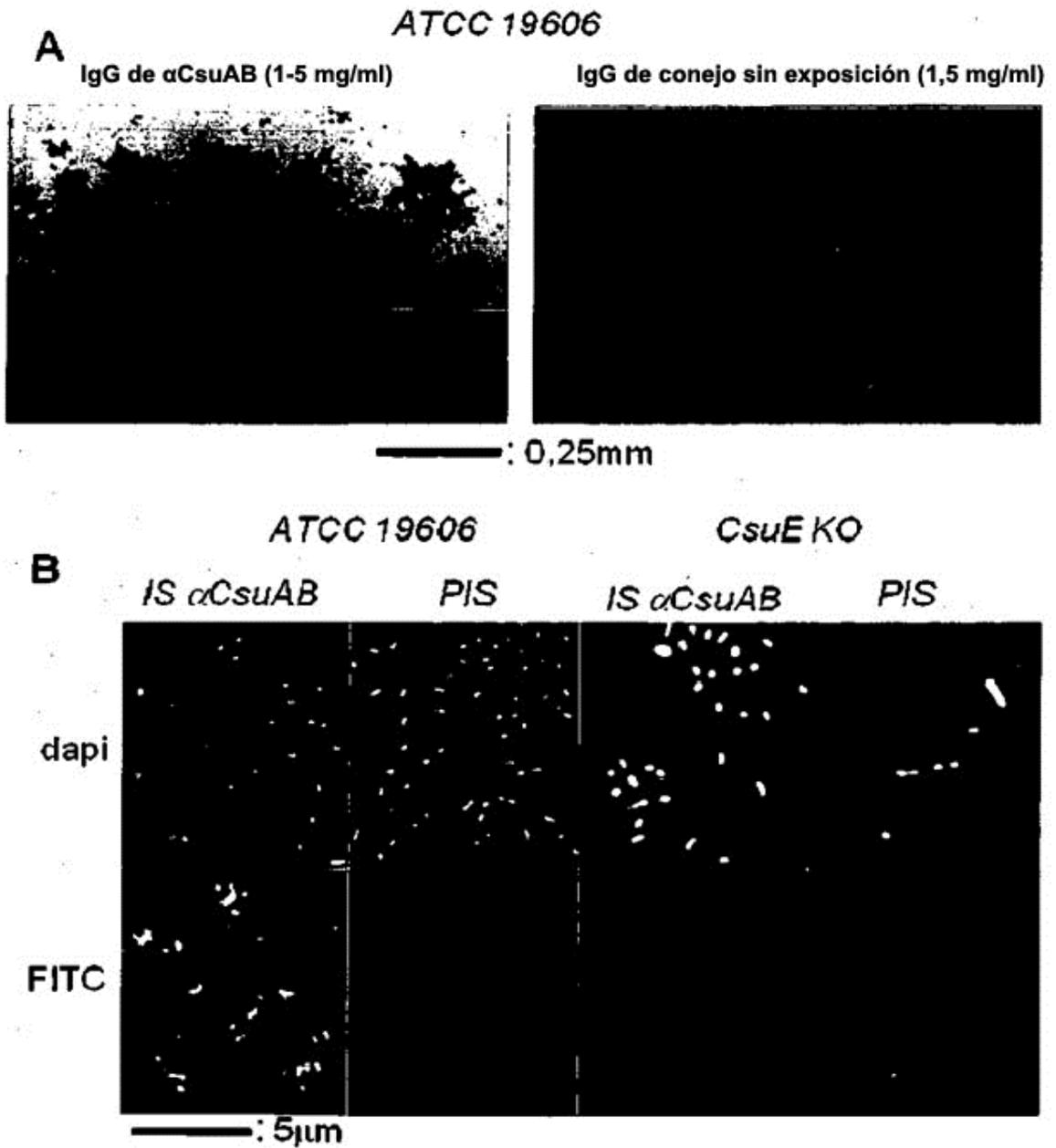


Figura 8

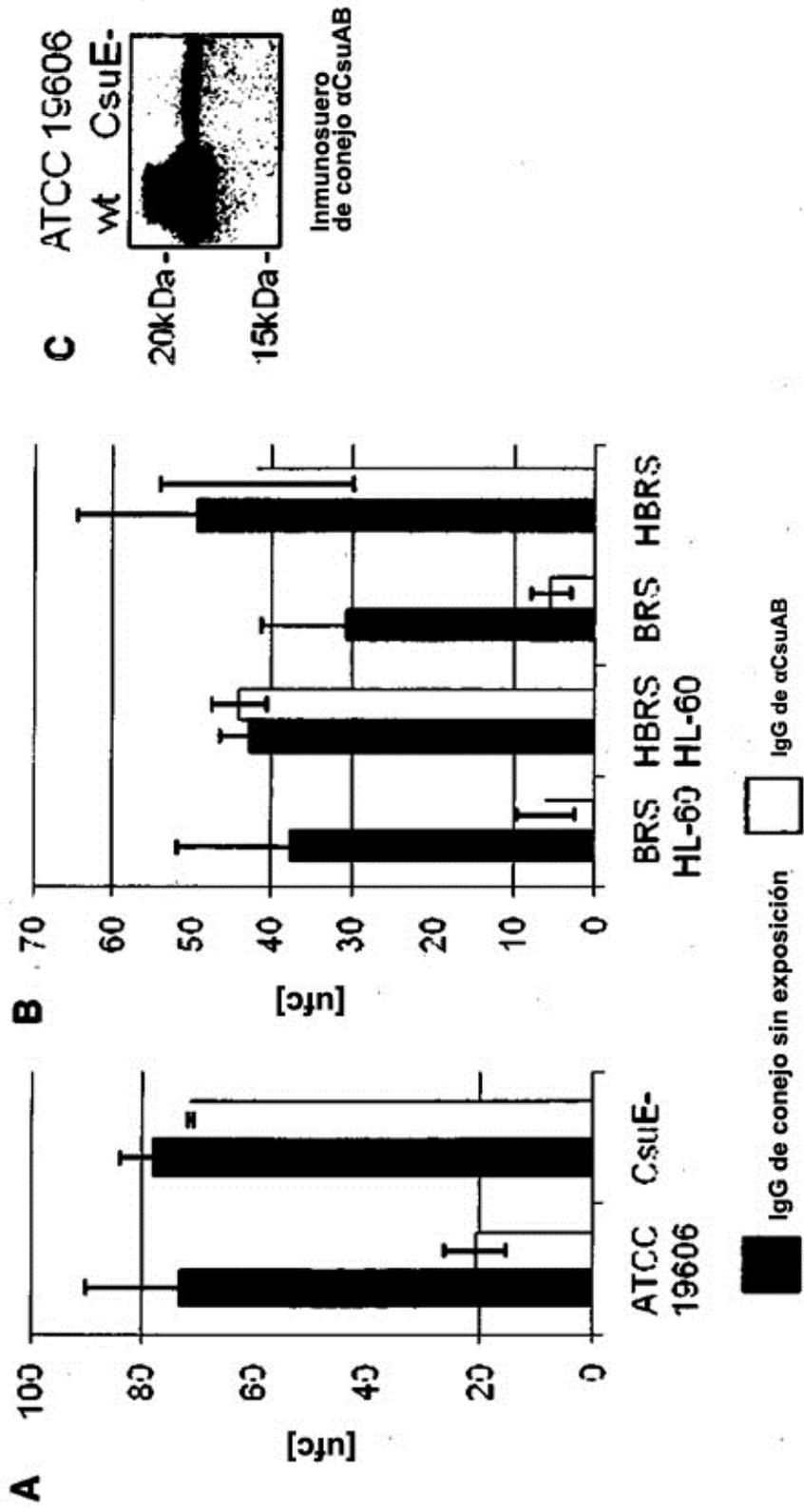


Figura 9: ensayo bactericida

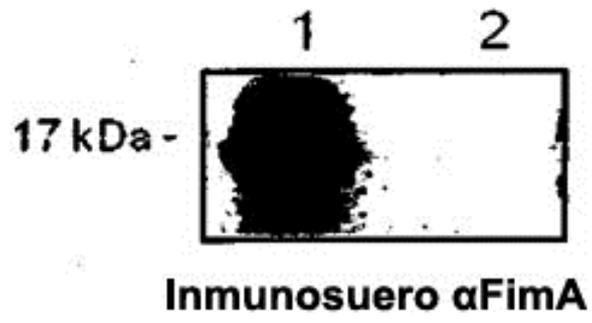


Figura 10

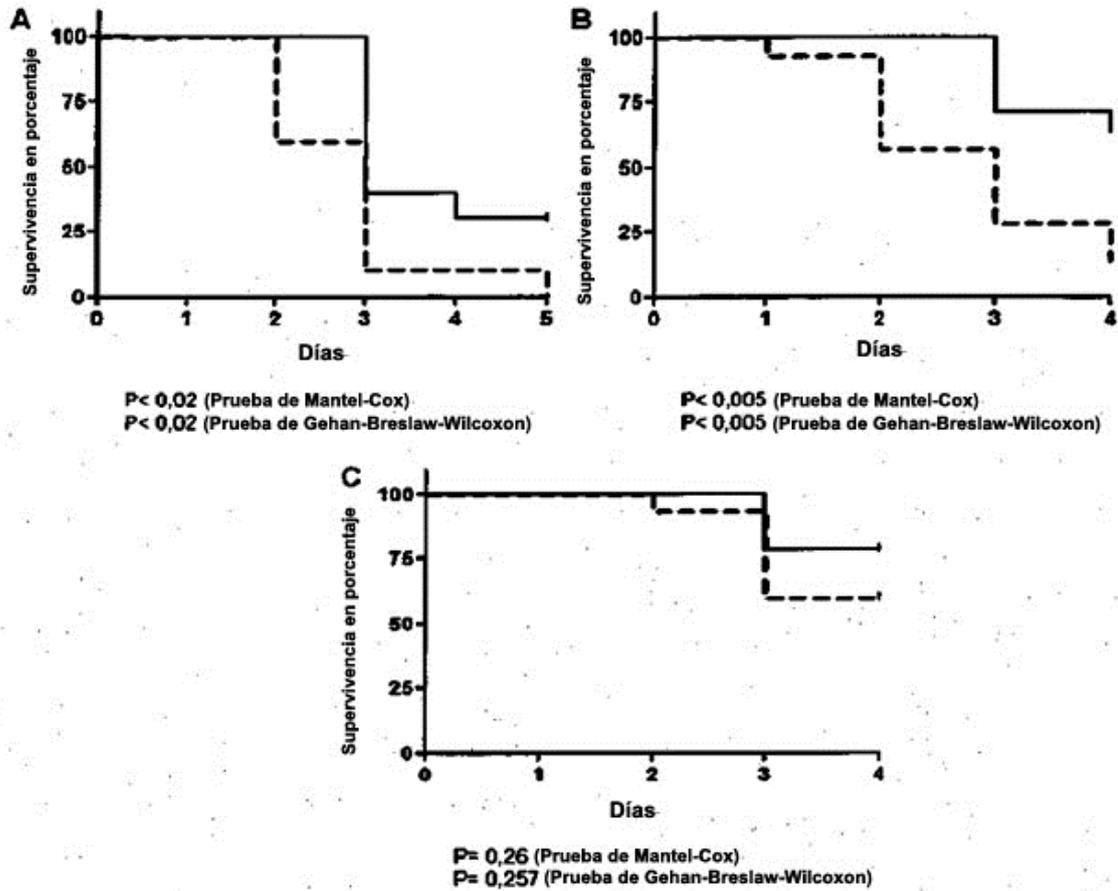


Figura 11: inmunización pasiva

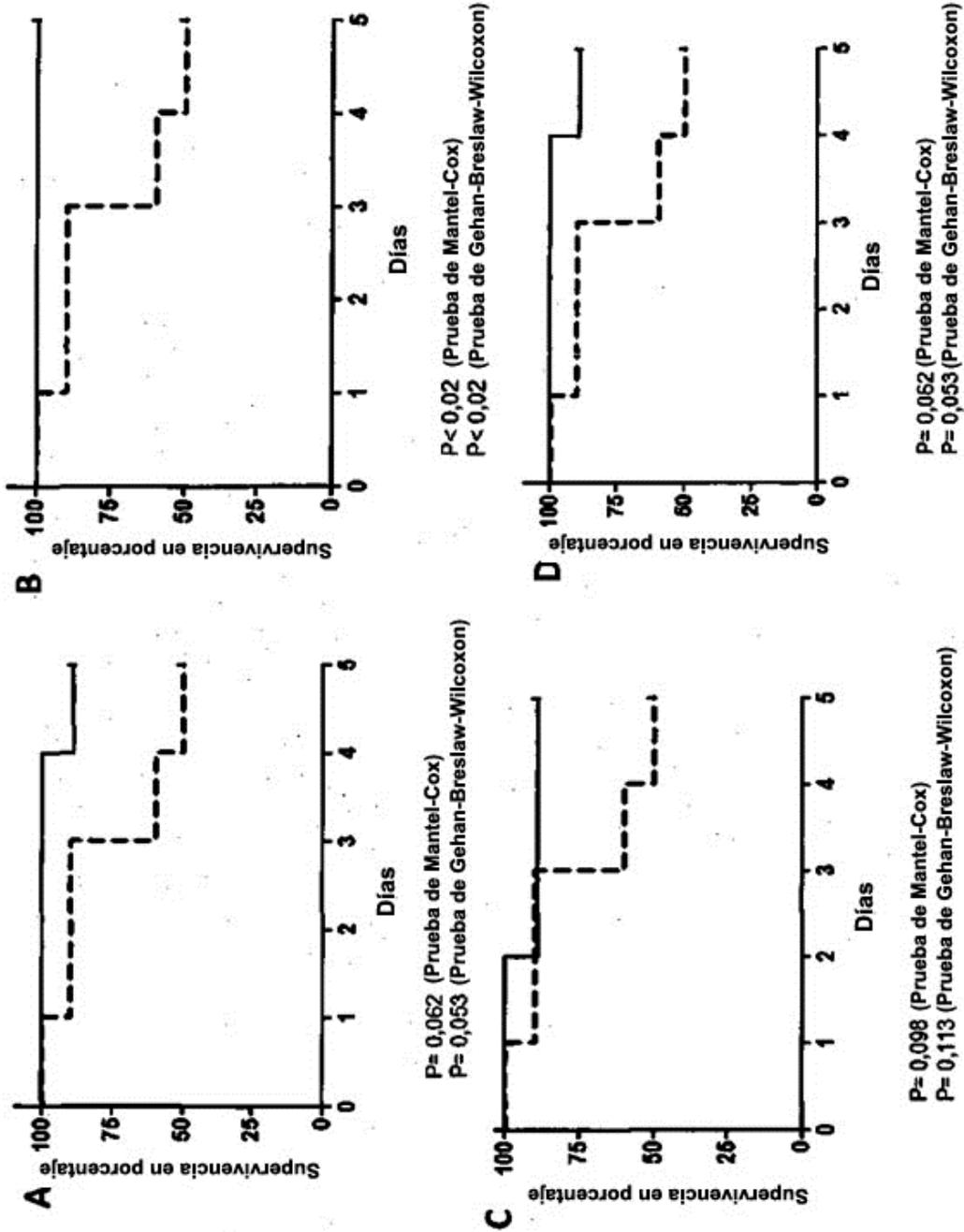
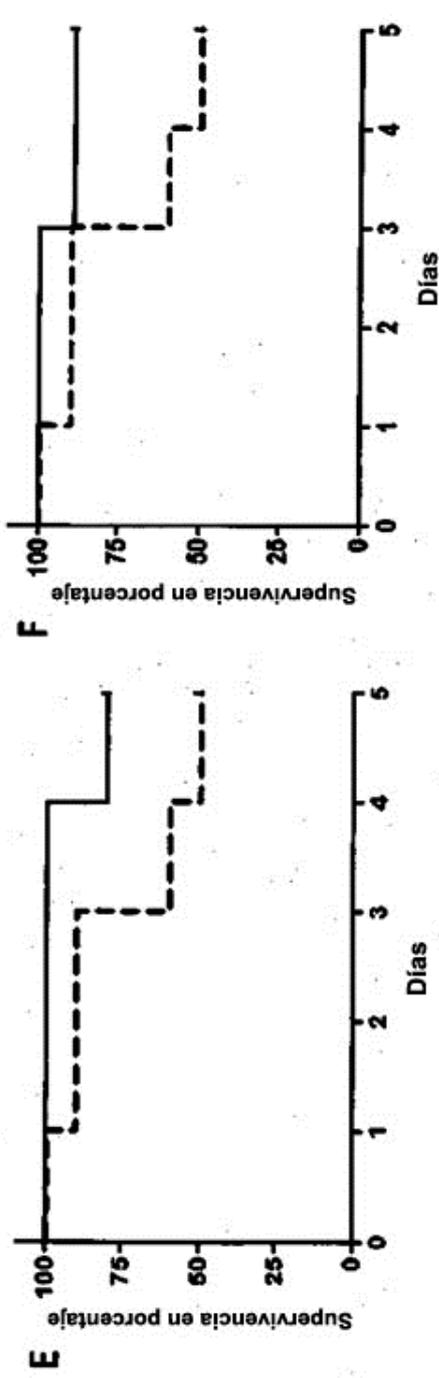
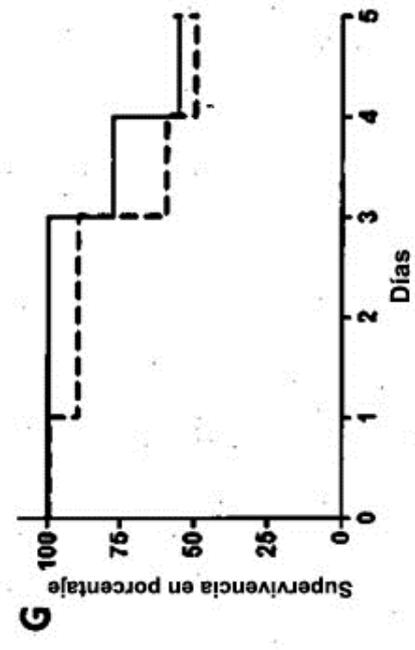


Figura 12: experimento de inmunización activa



P= 0,113 (Prueba de Mantel-Cox)
P= 0,088 (Prueba de Gehan-Breslaw-Wilcoxon)

P= 0,075 (Prueba de Mantel-Cox)
P= 0,082 (Prueba de Gehan-Breslaw-Wilcoxon)



P= 0,66 (Prueba de Mantel-Cox)
P= 0,56 (Prueba de Gehan-Breslaw-Wilcoxon)

Figura 12 (continuación)

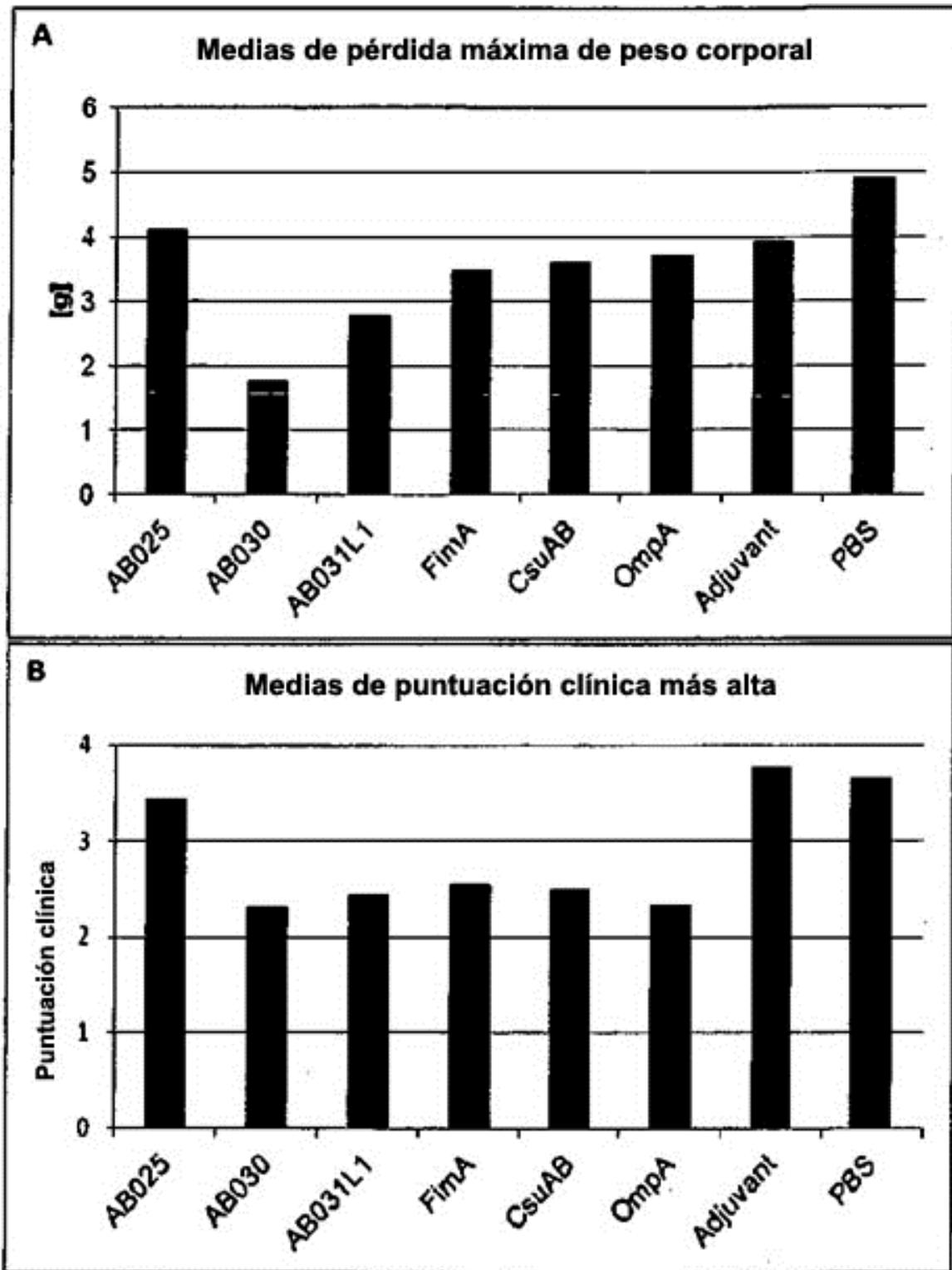


Figura 13