

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 417**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2010 E 10708230 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2532363**

54 Título: **Uso de flagelinas del género *Marinobacter* como adyuvantes vacunales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.05.2016**

73 Titular/es:

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y  
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA  
(100.0%)  
OTRI- Edificio INIA, Autovía A6 km. 7,5  
28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**GÓMEZ CASADO, EDUARDO**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 2 569 417 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

## USO DE FLAGELINAS DEL GÉNERO MARINOBACTER COMO ADYUVANTES VACUNALES

## CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención puede adscribirse al campo técnico de la medicina, preferentemente dentro de la rama de la inmunología, así como a la industria farmacéutica, específicamente en el campo tecnológico del desarrollo de vacunas.

La presente invención se refiere al uso de flagelinas recombinantes de bacterias de la especie *Marinobacter algicola*, como adyuvantes vacunales, capaces de desarrollar una respuesta inmune específica, contra péptidos o proteínas, fusionadas o sin fusionar, a dichas flagelinas. La presente invención también se refiere a vacunas que combinan flagelinas de bacterias de la especie *Marinobacter algicola* y flagelinas de bacterias de la especie *Salmonella typhimurium*.

## ANTECEDENTES

Flagelina es el nombre genérico de la proteína estructural principal que forma el flagelo de las bacterias. Son estructuras cilíndricas de diversa longitud (aprox. 530 nm) y alrededor de 21 nm de diámetro [1]. Los flagelos se observan tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, son estructuras de longitud diversa que permiten el movimiento de las bacterias en medios líquidos. El flagelo bacteriano aparte de estar formado por la flagelina, también lo constituyen otras muchas proteínas que intervienen en el ensamblaje, en la interacción con las envueltas externas de la célula, o que participan en procesos quimiotácticos.

El estudio de la estructura por difracción de rayos-X de la flagelina de bacterias del género *Salmonella* ha permitido ahondar en el conocimiento de su función e implicaciones biológicas [1, 2]. La flagelina puede jugar un papel importante en la patogénesis bacteriana [3] y se ha definido como un prototipo de “patrón molecular asociado a patógenos” (PAMPs) ya que es capaz de activar el sistema inmune innato a través de la interacción con receptores específicos [4], [5].

La mayoría de las flagelinas bacterianas son reconocidas por el receptor “Toll-like-5” (TLR5), que se localiza en la membrana de células epiteliales y células del sistema inmune: monocitos, linfocitos T, células NK y células dendríticas inmaduras. TLR5 es uno de los receptores de la familia “Toll-like” que tienen la capacidad de interactuar con PAMPs [6], teniendo cada TLR la capacidad de reconocer PAMPs específicos [7]. Una vez que la flagelina se une a TLR5, se inicia una cascada de transducción de señales a través de MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) para mediar en la producción de citocinas necesarias para el desarrollo y regulación de una respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador [8-10]. La unión de la flagelina de *Salmonella* al TLR5 es muy específica y actúa con una gran afinidad, a concentraciones tan bajas como  $8.5 \times 10^{-10}$  M [11]. Por otro lado, también es conocido que flagelinas de algunas bacterias no son capaces de activar el sistema inmune cuando se produce una infección natural, es decir no se unen al receptor TLR5 para inducir la respuesta inflamatoria [12]. El escape inmunológico de estas flagelinas se ha circunscrito a bacterias de los subgrupos alfa y epsilon (*Helicobacter pylori*, por ejemplo), mientras que las flagelinas respondedoras, aquellas que activan el sistema inmune del huésped, serían de los grupos beta y gamma [12]. El análisis molecular y funcional de las flagelinas no respondedoras, aquellas que no activan el sistema inmune del huésped, llevaron a definir una región específica de interacción de las flagelinas con el receptor TLR5, siendo esta región específica, la comprendida entre los aminoácidos 89-96 de las secuencias proteicas de las flagelinas [13].

El documento WO2005/070455 describe adyuvantes vacunales mucosos que contienen flagelinas originadas a partir de *Vibrio vulnificus*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* como componente activo [14]. Lee S *et al.* (2006) describe la muy potente actividad del adyuvante mucoso de una flagelina mayor de *Vibrio vulnificus* (FlaB), cuando se co-administra con la toxina del tétanos (TT) [15].

La mayoría de las vacunas actuales se componen del antígeno de interés y de adyuvantes [16], [17]. A pesar que los adyuvantes mejoran la respuesta inmune, también pueden provocar efectos secundarios adversos como ocurre con el adyuvante completo de Freund [18], [19], o incluso como es el caso de otros adyuvantes aprobados por la FDA o la EMEA. Para solucionar dicho problema asociado a la fabricación de vacunas y mejorar la efectividad de las mismas, se ha utilizado la flagelina de *Salmonella typhimurium* como adyuvante vacunal, ya que se ha demostrado que esta flagelina en fusión transcripcional a péptidos o proteínas induce frente a ellas una respuesta inmune humoral y celular, innata y adaptativa, muy rápida y potente. Algunas de las vacunas basadas en la flagelina de *Salmonella* se han dirigido contra el cólera [20], influenza [21], 20[22], peste (*Yersinia pestis*) [23], 22[24], malaria (*Plasmodium falciparum*) [25], y el virus West Nile [26].

La bacteria *Salmonella* se clasifica actualmente en las especies *S. bongori* y *S. enterica* [27]. La mayoría de las *Salmonella* que infectan a mamíferos y aves pertenecen a *S. enterica*, que se divide en seis subespecies (enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae, indica) con aproximadamente 2000 serotipos definidos en base a diferencias en composición de lipopolisacáridos (LPS) y antígenos del flagelo [27]. Algunos serotipos son exclusivos de hospedador como *S. typhi* (humanos) y *S. pullorum* (aves), y otros mayoritariamente adaptados a algún hospedador como *S. cholerae-suis* (porcinos), *S. abortus-ovis* (ovinos), y *S. dublin* (bovinos) [27].

La infección por *Salmonella* provoca la aparición de inmunidad celular y humoral contra diversos antígenos de dicha bacteria. Uno de estos antígenos es la flagelina, como así lo demuestran diversos estudios realizados en personas de origen caucásico de Dinamarca y Estados Unidos [28]-[29]. En un estudio aleatorio de población en EE. UU, el 30% tenían anticuerpos anti-flagelina de *Salmonella* [30]. Por otro lado, la capacidad de respuesta a flagelina en infecciones con bacterias es diversa, encontrándose altos respondedores y bajos respondedores a la reinmunización con flagelina [29]; atribuyéndose estos resultados a ciertos genotipos Gm de la flagelina [29]. Asimismo, las aves y otros animales son muy susceptibles de infección por *Salmonella* entérica [31]. Por tanto, las infecciones por *Salmonella* se producen en distintas especies y países, lo que indica la importancia del alcance de estas patologías, y por ello desde hace años se han establecido programas de control en humanos, mientras que es una enfermedad de declaración obligatoria en bovinos, ovinos y caprinos ([http://www.oie.int/esp/maladies/es\\_classification2009.htm?e1d7](http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification2009.htm?e1d7)). Todos estos datos indican que un porcentaje importante de la población que se infecta presenta anticuerpos contra la flagelina de *Salmonella*.

La mayoría de variantes de *Salmonella* tienen dos tipos de genes distintos que codifican para la flagelina, aunque sólo se expresa la flagelina de uno de estos genes a un tiempo. La bacteria es capaz de alternar la expresión de las dos flagelinas denominadas flagelina de fase 1 y flagelina de fase 2. El operon que controla la síntesis de la flagelina de fase 1 también codifica un represor de la síntesis de la flagelina de fase 2, y viceversa. Es posible que el mecanismo de cambio de fase 1 a fase 2 de síntesis de la flagelina sea consecuencia del intento de la bacteria de evitar la inmunidad celular

Un estudio reciente [32] ha aclarado mucho sobre los aspectos relacionados con la inmunogenicidad de la flagelina de *Salmonella typhimurium*. Los ratones que se inmunizan en sucesivas ocasiones con la flagelina producen anticuerpos que neutralizan la capacidad de interacción TLR5-flagelina. Estos anticuerpos se dirigen principalmente frente a la región hipervariable (RHPV) de la flagelina. La obtención de diversas flagelinas cuyas regiones hipervariables son eliminadas en distintos grados, ha permitido observar que estas flagelinas modificadas conservan su capacidad de interacción con TLR5, y reaccionan menos con un suero de ratón hiperinmune obtenido de inmunizarse con la flagelina salvaje. Sin embargo, la reactividad de un suero de ratón hiperinmune tras inmunizarse con una versión de flagelina sin RHPV, es muy similar entre la flagelina salvaje y otras sin RHPV, lo que indica que existen anticuerpos neutralizantes de las regiones conservadas de las flagelinas, incluyendo las regiones de interacción con TLR5. Por otro lado, la eliminación completa de la RHPV impide que la flagelina modificada inicie con normalidad la producción de citocinas inflamatorias (CCL20 y CXCL2) a nivel sistémico, si bien esta alteración en la flagelina no produce el mismo efecto a nivel de mucosas [32]. Es decir, cuando esta flagelina es inyectada falla en la producción de mediadores inflamatorios, pero tiene un comportamiento adecuado cuando se aplica a mucosas. En resumen, todos estos datos indican que:

1. La función de la flagelina puede ser neutralizada por anticuerpos preexistentes contra la flagelina salvaje (completa). Los anticuerpos generados contra una flagelina salvaje se dirigen fundamentalmente contra la región hipervariable.
2. Si se elimina la región hipervariable completamente, los anticuerpos generados contra la flagelina reconocen los dominios conservados entre los que se encuentra la región de interacción con TLR5. Por tanto, sería preferible no eliminar la región hipervariable puesto que es más inmunodominante, y así los anticuerpos generados no van dirigidos contra la región de interacción con TLR5.
3. Distintas versiones de la flagelina sin fragmentos de RHPV son funcionales al activar TLR5 a nivel de mucosas, pero no funcionan igual a nivel sistémico, salvo una de las versiones obtenidas que posee parte de RHPV, que sí se comporta como la flagelina salvaje. Sin embargo, ésta puede ser neutralizada, aunque en menor medida que la salvaje, por anticuerpos de sueros que han reaccionado contra la flagelina salvaje [30].

Todo lo expuesto indica que una vacuna basada en la flagelina de *Salmonella* capaz de activar el sistema inmune en todas sus formas, no podría usarse de forma repetida porque los anticuerpos preexistentes neutralizarían su potencial.

Por todo ello, sería un hito muy interesante para el desarrollo y aplicación de vacunas basadas en flagelinas, el disponer de otras flagelinas que indujeran la misma activación del sistema inmune innato y escaparan de la respuesta inmunológica desencadenada frente a las flagelinas de *Salmonella*.

En este sentido, la presente invención ha descubierto sorprendentemente que las vacunas basadas en flagelinas de bacterias marinas de la especie *Marinobacter algicola* son igual, o incluso más efectivas, que las vacunas basadas en las flagelinas de *Salmonella*. Al ser las bacterias de *Marinobacter algicola*, bacterias marinas, la infección previa de organismos no acuáticos es muy poco probable. Incluso se desconoce hasta la fecha, si dicha bacteria es capaz de infectar a organismos acuáticos. Hasta la fecha se han reconocido 12 especies de *Marinobacter* aisladas de distintas fuentes como conductos de extracción de crudo en plataformas marinas [33], en aguas termales de costa [34], aguas templadas [35] y aguas antárticas [36], suelos salinos [37] y sedimentos marinos [38]. Del estudio en laboratorio de diferentes algas se han aislado tres cepas de bacterias del género *Marinobacter*, que se han denominado *Marinobacter algicola*, procediendo dos del Mar Amarillo en la costa de Corea (DG893T y DG1136) y una de la Ría de Vigo en Galicia (GC21V) [39].

Al igual que en *Salmonella*, la bacteria *Marinobacter algicola* posee dos genes que codifican para dos flagelinas. Así, en la presente invención se describe el uso de las dos secuencias proteicas recombinantes de las flagelinas de la especie *Marinobacter algicola* (cepa DG893T), denominadas flagelina F y flagelina FR, capaces de inducir y desarrollar una respuesta inmune específica por sí solas, sin la ayuda de otros adyuvantes, indicando que dichas flagelinas son capaces de interaccionar de manera apropiada con el receptor TLR5, desencadenando la respuesta inmunológica. Pero

también, la presente invención pone de manifiesto que las flagelinas F y FR de *Marinobacter algicola* pueden fusionarse a péptidos, proteínas o antígenos vacunales, o bien administrarse conjuntamente con dichos péptidos y proteínas, pero sin fusionarse a los mismos, y desarrollar una respuesta inmune específica.

5 Además, se pone de manifiesto la escasa reactividad cruzada existente entre las flagelinas descritas en la presente invención del género *Marinobacter* y la flagelina de *Salmonella*. Esta escasa reactividad entre las flagelinas de ambas especies se debe a la relativa baja homología de secuencia existente entre ambas flagelinas (33%-36%). Es muy destacable el hecho de que la baja reactividad cruzada entre dichas flagelinas supone una ventaja en la efectividad de las vacunas basadas en las flagelinas de *Marinobacter*, ya que como hemos comentado anteriormente, podría existir una neutralización parcial de vacunas basadas en la flagelina de *Salmonella* en sujetos que hayan sufrido infección o contacto previo frente a *Salmonella*, o bien que hayan sido inmunizados previamente con la flagelina de *Salmonella*. Sin embargo, es muy poco probable tener inmunidad previa frente a bacterias del género *Marinobacter* ya que es una bacteria marina, que no se conoce que infecte al ser humano u otros organismos, y la probabilidad de contacto con organismos no marinos y producir en ellos una respuesta inmunológica es muy baja.

15 También se describen las diferentes estrategias de vacunación combinada basadas en la utilización de las dos flagelinas de *Marinobacter* descritas en la presente invención y la flagelina de *Salmonella typhimurium*. Así, en este sentido, los individuos que previamente hayan estado en contacto con *Salmonella*, podrían vacunarse utilizando las flagelinas de *Marinobacter* (F y FR), mientras que aquellos individuos no expuestos a *Salmonella* previamente, podrían llevar a cabo una estrategia diferente: en primer lugar, se podrían inmunizar con una vacuna basada en la flagelina de *Marinobacter* y posteriormente aplicar otra vacuna basada en la flagelina de *Salmonella*. Así, se potenciaría el uso de estas vacunas para múltiples antígenos sin restar eficacia por seroneutralización cruzada entre flagelinas.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

### Breve descripción de la invención

25 La presente invención se basa en el uso de dos flagelinas recombinantes, de la especie *Marinobacter algicola* (cepa DG893T), como adyuvantes vacunales capaces de desarrollar una respuesta inmune específica contra péptidos o proteínas fusionados a dichas flagelinas, o bien administrados conjuntamente sin fusionar. También se definen estrategias de vacunación combinada basadas en las dos flagelinas de *Marinobacter algicola* y la flagelina de *Salmonella typhimurium*, así como los métodos de síntesis de los adyuvantes vacunales que comprenden las flagelinas descritas en la presente invención.

### Descripción de las figuras

35 **Figura 1.** Niveles de IL-8 medidos por ELISA tras la estimulación de células CACO-2 en presencia de distintas flagelinas de *Marinobacter* (Flagelina F y FR) y *Salmonella typhimurium* (Flagelina STF y STF4DUD). STF4DUD: flagelina recombinante purificada de *Salmonella typhimurium* (STF) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD (DUD es una secuencia génica que codifica para un péptido de unión a dineína). Como controles negativos se han cultivado las células en presencia de PBS y en ausencia de PBS (MOCK). La figura representa la media aritmética de los niveles de IL-8 de dos mediciones realizadas mediante ELISA. Los resultados se expresan como la densidad óptica medida a 490 nm (eje Y).

40 **Figura 2.** Nivel de anticuerpos IgG (dilución 1/100) contra la secuencia DUD inducida por las distintas flagelinas y medido mediante ELISA. Los datos representados corresponden a las medias aritméticas de todos los animales (n=5) dentro de cada grupo. Los resultados se expresan como la densidad óptica medida a 405 nm (eje Y) de dos mediciones realizadas. STF4DUD: representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía subcutánea con la flagelina recombinante purificada de *Salmonella typhimurium* (STF) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD. F4DUD: representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía subcutánea con la flagelina recombinante purificada de *Marinobacter* (F) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD. FR4DUD: representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía subcutánea con la flagelina recombinante purificada de *Marinobacter* (FR) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD. F4DUD-in: representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía intranasal con la flagelina recombinante purificada de *Marinobacter* (F) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD. 4DUD: se corresponde con el control negativo del experimento. Representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía subcutánea con 4 copias en tándem del epítipo DUD, sin flagelinas.

50 **Figura 3.** Título de anticuerpos IgG (dilución 1/12800) contra la secuencia DUD inducida por las distintas flagelinas y medido mediante ELISA. Los resultados se expresan como la densidad óptica medida a 405 nm (eje Y) de dos mediciones realizadas. STF4DUD: representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía subcutánea con la flagelina recombinante purificada de *Salmonella typhimurium* (STF) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD. F4DUD: representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía subcutánea con la flagelina recombinante purificada de *Marinobacter* (F) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD. FR4DUD: representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía subcutánea con la flagelina

recombinante purificada de *Marinobacter* (FR) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD. F4DUD-in: representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía intranasal con la flagelina recombinante purificada de *Marinobacter* (F) fusionada a 4 copias en tándem del epítipo DUD. 4DUD: se corresponde con el control negativo del experimento. Representan los niveles de IgG obtenidos en el suero de ratones inmunizados vía subcutánea con 4 copias en tándem del epítipo DUD, sin flagelinas. 3x4DUD: es otro control negativo del experimento. Representa tres veces el valor de densidad óptica del tetrapéptido 4DUD. Dicho valor de densidad óptica sirve como línea de corte a partir de la cual todos los sueros deberían estar por encima para concluir que son capaces de producir una respuesta inmune potente.

**Figura 4.** Título de anticuerpos IgG contra la secuencia 4M2-2009 inducida por la flagelina de fusión FR-4M2-2009 y medido mediante ELISA. 4M2-2009: se corresponde con las 4 copias en tándem del epítipo M2-2009, perteneciente al virus de la gripe de la cepa pandémica A/Castilla-La-Mancha/GP13/2009/H1N1. Los resultados se expresan como la densidad óptica medida a 405 nm (eje Y) de dos mediciones realizadas. El eje X representa el grado de dilución de los sueros. R1, R2, R3 y R4 representan el suero de los ratones inoculados con la flagelina FR-4M2-2009. C1, C2, C3 y C4 representa el suero de los ratones control que fueron inoculados con el péptido M2-2009 en PBS.

**Figura 5.** Título de anticuerpos IgG que reconocen la flagelina STF de *Salmonella typhimurium*, y que están presentes en sueros anti-flagelina de *Salmonella typhimurium* (grupo de sueros A), en sueros anti-flagelina F de *Marinobacter* (grupo de sueros B), y en un suero anti-4DUD (suero D1). Se representa la densidad óptica medida a 405 nm (eje Y) de 2 mediciones realizadas. En el eje X se representa el suero de cada individuo de menor a mayor dilución (ver leyenda).

**Figura 6.** Título de anticuerpos IgG que reconocen la flagelina F de *Marinobacter*, y que están presentes en sueros anti-flagelina F de *Marinobacter* (grupo de sueros B), en sueros anti-flagelina de *Salmonella typhimurium* (grupo de sueros A), y en un suero anti-4DUD (suero D1). Se representa la densidad óptica medida a 405 nm (eje Y) de 2 mediciones realizadas. En el eje X se representa el suero de cada individuo de menor a mayor dilución (ver leyenda).

**Figura 7.** Título de anticuerpos IgG que reconocen la flagelina STF de *Salmonella typhimurium*, y que están presentes en un suero anti-flagelina STF de *Salmonella typhimurium* (suero A1), en sueros anti-flagelina FR de *Marinobacter* (grupo de sueros C), y en un suero anti-4DUD (suero D1). Se representa la densidad óptica medida a 405 nm (eje Y) de 2 mediciones realizadas. En el eje X se representa el suero de cada individuo de menor a mayor dilución (ver leyenda).

**Figura 8.** Título de anticuerpos IgG que reconocen la flagelina FR de *Marinobacter*, y que están presentes en sueros anti-flagelina FR de *Marinobacter* (grupo de sueros C), en sueros anti-flagelina de *Salmonella typhimurium* (grupo de sueros A), y en un suero anti-4DUD (suero D1). Se representa la densidad óptica medida a 405 nm (eje Y) de 2 mediciones realizadas. En el eje X se representa el suero de cada individuo de menor a mayor dilución (ver leyenda).

**Figura 9.** Título de anticuerpos IgG que reconocen la flagelina F de *Marinobacter*, y que están presentes en sueros anti-flagelinas F y FR de *Marinobacter*. Se representa la densidad óptica medida a 405 nm (eje Y) de 2 mediciones realizadas. Las barras enladrilladas representan el suero de ratones que contiene anticuerpos anti-flagelina FR (*Marinobacter*). Las barras negras y las barras con líneas oblicuas respectivamente representan el suero de 2 ratones diferentes que contiene anticuerpos anti-flagelina F (*Marinobacter*).

### Descripción detallada de la invención

La invención describe el uso de las flagelinas denominadas F y FR de la especie *Marinobacter algicola* (cepa DG893T) como adyuvantes vacunales y vacunas propiamente dichas, capaces de desarrollar una respuesta inmune específica contra péptidos, proteínas o antígenos vacunales fusionados a las flagelinas, o administrados sin fusionar junto con estas flagelinas. También define nuevas estrategias de vacunación combinada basadas en las dos flagelinas de *Marinobacter algicola* y la flagelina de *Salmonella typhimurium* (STF). Además de los métodos de síntesis de los adyuvantes vacunales que comprenden las flagelinas descritas en la presente invención.

Para demostrar la capacidad vacunal y adyuvantadora, *in vitro* e *in vivo*, de las flagelinas F y FR de *Marinobacter*, respecto a la flagelina STF de *Salmonella typhimurium*, en la presente invención se han utilizado diferentes versiones de las secuencias génicas codificantes de las proteínas recombinantes de las flagelinas mencionadas. Por un lado, las secuencias génicas codificantes de las flagelinas recombinantes por sí solas (F, FR y STF), y por otro lado, las secuencias génicas codificantes de las flagelinas recombinantes fusionadas a diferentes epítopos. Por epítipo se entiende una secuencia proteica de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunológico, específicamente por anticuerpos, células B o células T, y que además es capaz de generar respuesta inmunológica.

En la presente invención se han utilizado como epítopos la secuencia génica que codifica para un péptido de unión a dineína (DUD) y la secuencia génica que codifica para un péptido utilizado como diana vacunal del virus de la influenza o gripe. El péptido DUD está formado por la secuencia génica responsable de la unión de la proteína p54 (proteína responsable de la unión del virus de la peste porcina africana (PPA) a la célula hospedadora) [40] a una secuencia génica específica de las cadenas ligeras de la dineína, DLC8. La secuencia aminoacídica responsable de la unión de la proteína p54 a la cadena ligera de la dineína DCL8, la constituye un epítipo de 13 aminoácidos (SEQ ID NO:13) de dicha proteína p54 [41]. El péptido utilizado como diana vacunal frente al virus de la influenza, es el péptido conocido como ectodominio de la proteína M2 (M2e). La proteína M2 tiene un papel importante en el ciclo viral del virus influenza.

Forma un canal iónico que posibilita la entrada de protones al virus, disminuyendo el pH y permitiendo la disociación de la proteína de la matriz M1 de la ribonucleoproteína NP, para finalmente descargar todo el contenido en el citoplasma de la célula infectada. La región M2e está especialmente conservada. En la presente invención se ha seleccionado la región M2e del virus de la gripe de la cepa pandémica A/Castilla-La-Mancha/GP13/2009/H1N1 (M2-2009), que codifica para un péptido de 24 aminoácidos (SEQ ID NO:27). Anticuerpos frente a los epítomos SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:27, no aparecen en animales tras ser inmunizados en ausencia de adyuvantes con las proteínas recombinantes p54 y M2 respectivamente, únicamente aparecen en animales hiperinmunizados frente al virus de la PPA y frente al virus influenza, respectivamente, por lo que podemos decir que estos epítomos son buenos modelos para comprobar la capacidad vacunal y adyuvantadora de las flagelinas de *Marinobacter* F y FR respecto a la flagelina STF de *Salmonella typhimurium*.

Estudios previos han demostrado que la respuesta inmune que se desarrolla frente a cuatro copias en tándem de un epítomo, es mayor que frente a una sola copia ese epítomo [22]. Por este motivo, para demostrar la capacidad adyuvantadora-vacunal de las flagelinas de *Marinobacter*, la presente invención, ha utilizado las proteínas recombinantes de la flagelina F por sí sola (SEQ ID NO:20), de la flagelina F unida a una cola de histidinas y a una secuencia KDEL (SEQ ID NO:2), de la flagelina F fusionada a cuatro copias en tándem del péptido DUD modificado dando lugar a la flagelina F de fusión F4DUD (SEQ ID NO: 24) y la indicada flagelina F de fusión F4DUD unida a una cola de histidinas y a una secuencia KDEL (SEQ ID NO:6). También, en la presente invención se ha utilizado las proteínas recombinantes de la flagelina FR sola (SEQ ID NO:22), de la flagelina FR fusionada a una cola de histidinas y a una secuencia KDEL (SEQ ID NO:4), de la flagelina FR fusionada a cuatro copias en tándem del péptido DUD modificado dando lugar a la flagelina FR de fusión FR4DUD (SEQ ID NO: 26) y de dicha flagelina FR de fusión FR4DUD unida a una cola de histidinas y a una secuencia KDEL (SEQ ID NO:8). Además, se han utilizado las proteínas recombinantes de la flagelina FR fusionada a cuatro copias en tándem del péptido M2-2009 dando lugar a la flagelina FR de fusión FR4M2-2009 (SEQ ID NO:31) y de la flagelina FR de fusión FR4M2-2009 unida a una cola de histidinas y a una secuencia KDEL (SEQ ID NO:29). Por último, se ha utilizado la flagelina de *Salmonella typhimurium* (STF) sola (SEQ ID NO:15), flagelina STF fusionada a cuatro copias en tándem del péptido DUD modificado y unido a una cola de histidinas y a una secuencia KDEL dando lugar a la flagelina STF de fusión STF4DUD (SEQ ID NO: 10). El péptido DUD modificado (SEQ ID NO: 14) se diferencia del péptido DUD sin modificar (SEQ ID NO: 13) en que contiene una secuencia de aminoácidos de la región de unión de p54 ampliada con cinco aminoácidos más en su extremo 3' y siete aminoácidos más en su extremo 5', con el fin de que el reconocimiento de los epítomos para el desarrollo de la respuesta humoral sea lo más parecido posible a la respuesta inducida por la proteína completa en condiciones fisiológicas.

Así la presente invención analiza la funcionalidad y la capacidad adyuvante-vacunal de las flagelinas F y FR de *Marinobacter algicola* (cepa DG893T) en distintas versiones: F (SEQ ID NO:2), FR (SEQ ID NO:4), F4DUD (SEQ ID NO:6), FR4DUD (SEQ ID NO:8) y FR4M2-2009 (SEQ ID NO:29). Las flagelinas F4DUD (SEQ ID NO:6) y FR4DUD (SEQ ID NO:8), son las flagelinas F y FR que llevan 4 copias en tándem del péptido DUD fusionado en su extremo 3'. La flagelina FR4M2-2009 (SEQ ID NO: 29), es la flagelina FR que lleva 4 copias en tándem del péptido M2-2009, fusionado en su extremo 3'. Con el fin de comparar la actividad y función de las flagelinas de *Marinobacter*, también se ha obtenido la flagelina de *Salmonella typhimurium* en las siguientes versiones: STF (SEQ ID NO:15) y STF4DUD (SEQ ID NO:10), siendo esta última una flagelina de fusión que lleva 4 copias en tándem del péptido DUD fusionado en su extremo 3'.

Los genes de las flagelinas F (SEQ ID NO:1) y FR (SEQ ID NO:3) de *Marinobacter algicola* utilizados en la presente invención, se sintetizaron químicamente a partir de su secuencia primaria de ADN (Genbank: NZ\_ABCP01000018.1). En cambio, el gen de la flagelina STF de *Salmonella typhimurium* se obtuvo a partir del ADN de *Salmonella typhimurium* mediante la amplificación por PCR con cebadores específicos de secuencia SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12. Todas las secuencias de las flagelinas solas: F, FR y STF, y de las flagelinas de fusión con el epítomo en tándem, ya sea el epítomo DUD o el epítomo M2-2009: F4DUD, FR4DUD, STF4DUD y FR4M2-2009; incluyen en su extremo 3' ó 5', una cola de histidinas para que las proteínas recombinantes expresadas posteriormente, ya sea mediante el sistema baculovirus-células de insecto, o mediante la transformación de bacterias con los plásmidos portadores de dichas secuencias, sean más fáciles de purificar posteriormente mediante cromatografía, aunque puede utilizarse cualquier método o sistema reconocido en el estado de la técnica que facilite la posterior purificación de dichas proteínas recombinantes. Además, también se ha incluido en todas las secuencias de las flagelinas descritas en la presente invención, la secuencia de aminoácidos "KDEL" que sirve para la retención de las proteínas en retículo endoplásmico quedando así menos expuestas a degradación, incrementándose finalmente la obtención de la proteína expresada. De la misma manera que se ha comentado anteriormente, se puede utilizar cualquier secuencia aminoacídica capaz de evitar la degradación de las proteínas recombinantes obtenidas. En el caso particular de la presente invención, incrementándose la obtención de las flagelinas de interés F, F4DUD, FR, FR4DUD, FR4M2-2009, STF y STF4DUD.

La presente invención pone de manifiesto la capacidad de las flagelinas de *Marinobacter* para evocar una respuesta inmune similar a la desencadenada por la flagelina STF de *Salmonella typhimurium*, tanto a nivel *in vitro*, siendo capaz de inducir la liberación de la citocina IL-8 al medio extracelular en cultivos celulares en presencia de las flagelinas F y FR (Figura 1); como *in vivo*, llegándose a obtener niveles similares de anticuerpos IgG anti-DUD (Figura 2) en muestras de sueros procedentes de ratones inmunizados vía subcutánea (sc) o intranasal (in) con las flagelinas de fusión purificadas de *Marinobacter*, F4DUD y FR4DUD, respecto a los ratones inmunizados con la flagelina de fusión de

*Salmonella typhimurium* STF4DUD (Figuras 2 y 3). De la misma manera se obtuvieron altos niveles de anticuerpos IgG anti-4M2-2009 en muestras de sueros procedentes de ratones inmunizados vía subcutánea con las flagelinas de fusión purificadas FR-4M2-2009, frente a los niveles obtenidos en los sueros de ratones control inmunizados con el péptido M2-2009 en PBS (Figura 4). Por lo tanto, estos resultados ponen de evidencia que las flagelinas de *Marinobacter* interactúan de manera apropiada con el receptor TLR5, y de forma similar a la flagelina de *Salmonella typhimurium*.

Las secuencias aminoacídicas de las flagelinas F y FR de *Marinobacter*, que interactúan con TLR5 desencadenando la activación del sistema inmune, son distintas a las de Flagelina de *Salmonella typhimurium*. Estas secuencias aminoacídicas de interacción entre el receptor TLR5 y las flagelinas FR y F vienen definidas por SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 respectivamente. En la presente invención también se ha demostrado que la secuencia de interacción de la flagelina F ampliada con algún aminoácido más en su región 3' (SEQ ID NO: 18) sigue siendo capaz de unirse al receptor TLR5 y desencadenar la activación del sistema inmune. Mediante los programas bioinformáticos BLAST y CLUSTAL W [42-44], se ha analizado la homología existente entre las secuencias proteicas de las flagelinas F (SEQ ID NO:20) y FR (SEQ ID NO:22) de *Marinobacter algicola* (Cepa DG893T) y la flagelina STF (SEQ ID NO:15) de *Salmonella typhimurium* poniendo en evidencia que:

a) Cuando se analizan las secuencias completas de todas las flagelinas mencionadas, la homología entre F y FR es de un 63%, entre F y STF es de un 33%, y entre FR y STF es de un 36%.

b) Cuando se analizan las regiones más conservadas (excluyendo la parte central que es hipervariable) que corresponden a los primeros 170 aminoácidos de la zona amino-terminal, y a los 90 aminoácidos últimos (zona carboxilo-terminal) de las flagelinas mencionadas, la homología entre F y FR es de un 78%, entre F y STF es de un 55%, y entre FR y STF es de un 57%.

En esta invención también se ha analizado la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-flagelina de *Salmonella typhimurium* frente a las flagelinas de *Marinobacter*, y viceversa, así como la reactividad cruzada entre ambas flagelinas de *Marinobacter* (Figuras 5-9). La finalidad de dicho análisis ha sido estudiar la presencia de anticuerpos capaces de reconocer distintas flagelinas, después de un proceso de inmunización estándar, aunque en la presente invención se han utilizado dosis de flagelinas vacunales más elevadas de lo necesario (30 µg) para desarrollar una respuesta inmune efectiva con dichas moléculas. Como se ha comentado con anterioridad, los anticuerpos generados frente a la flagelina con la que se inmunizó (por ejemplo, de *Salmonella typhimurium*) podrían ser específicos de regiones que no interactúan con el TLR5 o de regiones que sí son importantes en este reconocimiento. En definitiva, la aparición de estos anticuerpos puede neutralizar la funcionalidad de nuevas administraciones de flagelina vacunal, por lo que hace más complicado el uso reiterado como vacuna de la flagelina de un mismo organismo. Por otro lado, la ausencia de reconocimiento de los anticuerpos generados por la flagelina de la especie *Salmonella typhimurium* respecto a las flagelinas de *Marinobacter*, y viceversa, permitiría establecer nuevas estrategias de vacunación, que solventaran dicho problema.

Los resultados mostrados en la presente invención indican que los anticuerpos anti-flagelina F de *Marinobacter* reconocen levemente, en general, la flagelina de *Salmonella typhimurium* STF (Figura 5), teniendo el suero que es más positivo en anticuerpos anti-F entre 16 y 32 veces menos reconocimiento sobre la flagelina de *Salmonella* (STF) que un suero positivo. Los sueros anti-flagelina FR también reaccionan levemente ante la flagelina STF, si bien el suero más positivo reconoce 32 veces menos la flagelina STF que un control positivo (Figura 7).

Por su parte los anticuerpos anti-flagelina (STF) de *Salmonella typhimurium* reconocen levemente la flagelina F (Figura 6), y es prácticamente inexistente el reconocimiento de la flagelina FR de *Marinobacter* (Figura 8) a dilución 1/100. Los sueros anti-flagelina de *Salmonella typhimurium* tienen un título de IgG mayor de 1/12800, y que podría alcanzar 1/25600, lo que indica que la escasa reactividad cruzada entre las flagelinas de *Marinobacter* (especialmente FR) y *Salmonella typhimurium* se explicaría por su baja homología de secuencia que corresponde a un 33%-36%. Sin embargo, los anticuerpos anti-F y anti-FR presentan una reactividad cruzada con las flagelinas de *Marinobacter* FR y F, respectivamente. Este hecho se explica por el grado de homología existente entre las flagelinas F y FR que corresponde al 63% de la estructura completa, y a un 78% de la estructura que representa las zonas más conservadas, como se ha mencionado anteriormente.

La presente invención describe una nueva estrategia de vacunación basada en el uso de las flagelinas F y FR de *Marinobacter*. Por un lado, propone utilizar vacunas basadas en la flagelina F o FR en aquellos individuos que hayan estado en contacto con *Salmonella typhimurium* y presenten anticuerpos anti-flagelina de *Salmonella* por infecciones previas o por inmunización previa con la flagelina de *Salmonella typhimurium*, pudiendo estos individuos vacunarse con al menos una dosis efectiva de una de las flagelinas de *Marinobacter* unida o administrada conjuntamente a un epítipo específico para generar la inmunidad y por otro lado, vacunarse con al menos otra dosis efectiva de la otra flagelina de *Marinobacter* unida o administrada conjuntamente a otro epítipo diferente del anterior, generando así doble inmunidad frente a dos epítipos diferentes. Por otro lado, se propone que en aquellos individuos no expuestos a *Salmonella* previamente, ni inmunizados aún con su flagelina, se les podría inmunizar primero con al menos una dosis efectiva de una vacuna basada en cualquiera de las flagelinas de *Marinobacter* (F o FR) y posteriormente se les aplicaría al menos otra dosis efectiva basada en la flagelina de *Salmonella*, preferentemente basada en la flagelina de *Salmonella typhimurium*, y viceversa, es decir, inmunizarles primero con al menos una dosis efectiva de una vacuna basada en la flagelina de *Salmonella*, preferentemente *Salmonella typhimurium* y en segundo lugar inmunizarles con al menos una dosis efectiva de una vacuna en cualquiera de las flagelinas de *Marinobacter* (F o FR). Otra estrategia de vacunación a contemplar en individuos que no presentan inmunidad previa frente a la flagelina de *Salmonella*, preferentemente

5 *Salmonella typhimurium* es inmunizarlos con al menos una dosis efectiva de una vacuna basada en esta flagelina, posteriormente inmunizarlos con al menos una dosis efectiva de una vacuna basada en una de las flagelinas de *Marinobacter* unida o administrada conjuntamente a un epítipo específico para generar la inmunidad y por otro lado, inmunizarlos al menos una dosis efectiva de una vacuna basada en la otra flagelina de *Marinobacter* unida o  
 10 administrada conjuntamente a otro epítipo diferente del anterior, generando así triple inmunidad frente a tres epítopos diferentes. El orden de administración de las dosis efectivas de las vacunas en los individuos se puede realizar indistintamente, primero vacunando con las vacunas basadas en las flagelinas de *Marinobacter* y en segundo lugar vacunando con la vacuna basada en la flagelina de *Salmonella typhimurium* y viceversa. Mediante las estrategias de vacunación descritas en la presente invención se potencia el uso de las vacunas para múltiples antígenos sin restar eficacia por posible seroneutralización cruzada entre flagelinas.

Así uno de los objetos de la presente invención se refiere a un adyuvante vacunal que comprende al menos una flagelina del género *Marinobacter*, preferentemente de la especie *Marinobacter algicola*.

15 En otra realización preferida, el adyuvante vacunal de la invención puede fusionarse al menos a un epítipo capaz de generar respuesta inmunológica preferentemente 4 copias en tándem. En otra realización preferida de la invención, los epítopos capaces de generar respuesta inmunológica, no se fusionan al adyuvante vacunal, sino que pueden ser administrados conjuntamente con él, pero sin estar fusionados al mismo.

En otra realización preferida, el adyuvante vacunal de la invención comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18.

20 En otra realización preferida, el adyuvante vacunal de la invención se caracteriza por contener, al menos, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:29 ó SEQ ID NO:31 ó una secuencia de aminoácidos codificada por: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:28 ó SEQ ID NO:30.

25 Otro objeto de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende al menos un adyuvante vacunal según se ha descrito anteriormente, opcionalmente comprendiendo otros adyuvantes vacunales, además también puede contener un epítipo capaz de generar respuesta inmunológica, pero no fusionado al adyuvante vacunal.

Otro objeto de la presente invención se refiere al método de síntesis de adyuvantes vacunales caracterizados por comprender al menos una flagelina bacteriana del género *Marinobacter* caracterizado por:

- 30 a) Seleccionar al menos una de las secuencias génicas que codifican para flagelinas del género *Marinobacter*.  
 b) Clonar al menos una de las secuencias génica del paso anterior en un vector de expresión.  
 c) Generar organismos modificados mediante la inserción de vector del paso anterior.  
 d) Crecer los organismos modificados del paso anterior en condiciones adecuadas para favorecer la expresión de al menos una de las secuencias incluidas en el vector  
 e) Aislar al menos una de las proteínas expresadas por los organismos portadores del vector de expresión del  
 35 paso anterior.

En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque las secuencias génicas que codifican para las flagelinas se selecciona preferentemente entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:30.

40 En una realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque a las secuencias génicas que codifican para las flagelinas del género *Marinobacter* se les puede añadir al menos un epítipo capaz de generar respuesta inmunológica específica, preferentemente 4 copias en tándem.

45 En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque a las secuencias génicas de las flagelinas del género *Marinobacter* se le puede añadir una secuencia génica que codifica para un péptido capaz de facilitar el aislamiento o purificación de la flagelina. Esta secuencia puede ser añadida tanto en el extremo 3' como en el extremo 5', siendo preferentemente añadida en el extremo 3'.

En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque la secuencia que codifica para una secuencia peptídica capaz de facilitar el aislamiento o purificación de la flagelina es preferentemente una cola de histidinas.

50 En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque a las secuencias génicas de las flagelinas del género *Marinobacter* también se les puede añadir una secuencia génica que codifica para un péptido capaz de evitar la degradación de la flagelina, siendo preferentemente una secuencia que codifica para el péptido KDEEL.

En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque el vector de expresión utilizado se selecciona preferentemente los comprendidos en las cepas: CECT 7633, CECT 7634, CECT 7635 y CECT 7636.

55 En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque los organismos modificados se seleccionan preferentemente entre virus y bacterias.

En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque los virus son preferentemente baculovirus.



En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza porque los virus generados mediante el método de la invención son preferentemente Baculovirus y se utilizan para transfectar células de mamífero o de insecto, siendo preferentemente utilizadas las células de insecto.

5 Otro objeto de la presente invención se refiere a un vector de expresión que se caracteriza por comprender cualquiera de las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:30 y que se selecciona preferentemente entre cualquiera de los comprendidos en las cepas: CECT 7633, CECT 7634, CECT 7635 y CECT 7636.

Es otro objeto de la presente invención los virus transformados con cualquiera de los vectores de expresión mencionados anteriormente, siendo preferentemente baculovirus.

10 Es otro objeto de la presente invención las bacterias transformadas con cualquiera de los vectores de expresión mencionados anteriormente, siendo preferentemente bacterias de la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$ .

Otro objeto de la presente invención son las células infectadas con los virus transformados vectores descritos anteriormente, pudiendo ser células de mamífero o insecto.

15 Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las secuencias seleccionadas entre: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:31 para la fabricación de adyuvantes vacunales y/o vacunas.

20 Es otro objeto de la presente invención un método de vacunación que comprende la administración a un individuo, de al menos, una dosis efectiva de una vacuna que comprenda los adyuvantes vacunales de la invención.

En una realización preferida, el método de vacunación de la invención se caracteriza porque comprende además la administración a un individuo, de al menos, una segunda dosis efectiva de una vacuna que comprenda, al menos, una flagelina de *Salmonella typhimurium* como adyuvante vacunal, antes o después de la administración de la dosis cualquiera de las vacunas según se han descrito en la presente invención.

25 La dosis efectiva, es aquella dosis mínima capaz de producir el efecto deseado. En el caso de la presente invención se entiende por dosis efectiva aquella dosis mínima capaz de inducir una respuesta inmunológica específica en los individuos a los que se les administra una vacuna. Se pueden administrar diferentes dosis de cada una de las vacunas, hasta conseguir la inmunidad en el individuo.

### 30 DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS SEGÚN EL TRATADO DE BUDAPEST

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  portadoras de los plásmidos utilizados en la presente invención fueron depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus Burjassot, Burjassot 46100 (Valencia, España) el día 26 de Noviembre del año 2009 con nº de depósito:

- 35 • CECT 7633: pFastBac-FR4DUD-HisKdel; contiene la secuencia génica que codifica para la flagelina recombinante FR de *Marinobacter*, unida a 4 copias en tándem del epítipo DUD.
- CECT 7634: pFastBac-F4DUD-HisKdel; contiene la secuencia génica que codifica para la flagelina recombinante F de *Marinobacter*, unida a 4 copias en tándem del epítipo DUD.
- CECT 7635: pFastBac-F-HisKdel; contiene la secuencia génica que codifica para la flagelina recombinante F de *Marinobacter*.
- 40 • CECT 7636: pFastBac-FR-HisKdel; contiene la secuencia génica que codifica para la flagelina recombinante FR de *Marinobacter*.

Todas ellas comprenden además la secuencia génica que codifica para una cola de histidinas y para el péptido KDEL.

Los ejemplos que se detallan a continuación tienen como objetivo ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma.

### 45 Ejemplo 1. Obtención y purificación de las secuencias recombinantes de las flagelinas.

En la presente invención se estudian la funcionalidad y la capacidad adyuvante-vacunal de las flagelinas F y FR de *Marinobacter algicola* (cepa DG893T). Con el fin de comparar la actividad y función de las flagelinas de *Marinobacter*, también se ha obtenido y utilizado la flagelina STF de *Salmonella typhimurium*.

50 Los genes F y FR de las flagelinas de *Marinobacter algicola* se sintetizaron químicamente (MrGene, Alemania) a partir de las secuencias primarias de DNA de ambas flagelinas SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:21 respectivamente. Posteriormente a dichas secuencias se les añadió una secuencia que codifica para una cola de histidinas (para facilitar la purificación de la proteína recombinante obtenida) y una secuencia que codifica para el péptido KDEL (evita la degradación de la proteína recombinante obtenida). Por otro lado, a partir del DNA de *Salmonella typhimurium* (GenBank: AY649721) se obtuvo el gen de la flagelina mediante la amplificación por reacción en cadena de la

polimerasa con cebadores específicos, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. Las condiciones de PCR fueron: 5 min a 96 °C; 30 ciclos de 20 seg a 96 °C, 30 seg a 60 °C, 1 min y 45 seg a 72 °C; y un ciclo final de 10 min a 72 °C.

5 Como se ha comentado anteriormente, en todas las secuencias génicas de las flagelinas se han incluido en su extremos 3' (aunque puede incluirse también en el extremo 5'), una secuencia que codifica para una cola de histidinas, utilizada posteriormente para la purificación de dichas proteínas tras su expresión y una región que codifica para el péptido "KDEL" que sirve para la retención de proteínas en retículo endoplásmico, quedando así menos expuesta la proteína recombinante a su degradación, e incrementándose así la obtención de de la proteína expresada. Además, todas las secuencias génicas de DNA de las flagelinas utilizadas, incluían dianas de restricción (Bam HI y Xba I) para posteriormente ser clonadas en el plásmido pFastbac. Para la transformación y crecimiento de los diferentes plásmidos portadores de las secuencias de las flagelinas de la invención, se ha usado la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Dichas cepas fueron depositadas en la Colección Española de Cultivos tipo con número de depósito CECT 7633 (pFastBac-FR4DUD-HisKdel), CECT 7634 (pFastBac-F4DUD-HisKdel), CECT 7635 (pFastBac-F-HisKdel) y CECT 7636 (pFastBac-FR-HisKdel).

15 Las proteínas recombinantes de las flagelinas se obtuvieron mediante dos mecanismos diferentes, por un lado, utilizando baculovirus recombinantes mediante el uso del sistema comercial "Bac-to-Bac® Baculovirus system" (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente transfectando células de insecto (utilizadas como biobacteria) con dichos baculovirus recombinantes, para obtener las flagelinas recombinantes. El otro mecanismo de obtención de las flagelinas recombinantes fue mediante la obtención de un plásmido recombinante específico para la transformación de bacterias BL21(DE3)pLysS siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Reino Unido). Posteriormente la expresión de las proteínas recombinantes de las flagelinas en dichas bacterias se indujo mediante la adición al medio de cultivo bacteriano de IPTG (isopropil-b-D-tiogalactósido, es un inductor artificial del gen lacZ, determinante de la  $\beta$ -galactosidasa).

25 Para la obtención de las flagelinas recombinantes a partir de los baculovirus recombinantes generados, estos se crecieron hasta alcanzar un título de 10<sup>8</sup> pfu/mL. Posteriormente, con dichos baculovirus recombinantes se transfectaron durante 72 horas, células de insecto Sf21 y Sf9 de la especie *Spodoptera frugiperda*, que crecen en monocapa y suspensión, respectivamente. Transcurrido este tiempo se procedió a purificar las flagelinas recombinantes mediante cromatografía de afinidad gracias a la cola de histidinas (Clontech-Takara Bio Europe, Francia; Amocol, Alemania) que llevan incorporada todas las flagelinas expresadas.

30 Para la obtención de las flagelinas recombinantes mediante la transformación de bacterias, se procedió de la siguiente manera. A partir de los plásmidos con las secuencias de las flagelinas de la invención, y mediante digestión con las enzimas de restricción Bam HI y Hind III, se aisló el fragmento de interés que contiene la flagelina de fusión junto con la cola de histidinas y la secuencia KDEL, y se clonó mediante procedimientos estándar (rapid DNA ligation kit, Roche, España) en el vector pRSET-A (Invitrogen, Reino Unido), para dar lugar al plásmido recombinante pRSETA unido a la secuencia de la flagelina de interés. Con el plásmido recombinante pRSETA se transformaron bacterias BL21(DE3)pLysS siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Reino Unido). La expresión de la proteína en estas bacterias transformadas se indujo tras añadir IPTG a una concentración final de 1mM. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad como se ha explicado previamente.

## Ejemplo 2. Estudio *in vitro* de la actividad de las flagelina F y FR de *Marinobacter*.

40 Para analizar la actividad *in vitro* de las flagelinas recombinantes F y FR de *Marinobacter* obtenidas mediante el método comercial "Bac-to-Bac® Baculovirus system" (Invitrogen, USA), se utilizaron células humanas de carcinoma de colon CACO-2 que expresan el receptor TLR5 de forma constitutiva. Cuando TLR5 se activa en estas células induce la activación de MyD88 para finalmente secretar IL8 al medio extracelular [8-10].

45 Se cultivaron células CACO-2 (0.5 ml) en una placa de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca) con una confluencia del 80% y una concentración de 5x10<sup>5</sup> células/pocillo. Posteriormente se añadió al medio de cultivo las proteínas recombinantes de las flagelinas STF (*Salmonella typhimurium*) utilizadas como control positivo, F y FR (*Marinobacter algicola*) a una concentración final de 1 ug/mL, y se incubaron durante 18 horas a 37° C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Como controles negativos se utilizaron muestras a las que no se les añadió nada (MOCK) y otras a las que se les añadió PBS. Transcurrido dicho tiempo, se recogieron los sobrenadantes y 100 uL de los mismos se usaron en la determinación de los niveles secretados de la citocina IL-8 mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (eBioscience, Ltd, Reino Unido). La densidad óptica se midió a 490 nm tras detener la reacción de revelado.

50 Los niveles de IL-8 secretados por las células CACO-2 cultivadas en presencia de las distintas flagelinas, se muestran en la Figura 1. Las flagelinas F y FR de *Marinobacter* inducen la secreción de IL-8, mediante la activación de TLR5, a unos niveles similares a los que induce la flagelina de *Salmonella typhimurium* (STF) sola o en fusión con el péptido 4DUD (STF4DUD). Por otro lado, los controles negativos de CACO-2 (PBS y MOCK) muestran una densidad óptica muy baja, lo que indica la validez del ensayo. Los valores representados corresponden a las medias aritméticas de dos ensayos independientes.

**Ejemplo 3. Estudio “in vivo” de capacidad vacunal e inmunogenicidad de las flagelinas de fusión de *Marinobacter F y FR* unidas a 4 copias en tándem del epítipo DUD.**

Para analizar *in vivo* la capacidad vacunal e inmunogenicidad de las flagelinas F y FR de *Marinobacter* obtenidas mediante el método comercial “Bac-to-Bac® Baculovirus system” (Invitrogen, USA), se han inmunizado por la vía subcutánea (sc), grupos de 5 ratones con 30 ug de las flagelinas de fusión purificadas STF4DUD (*Salmonella typhimurium*), F4DUD y FR4DUD (*Marinobacter algicola*). También se ha inmunizado por vía intranasal (in) un grupo de 5 ratones con la proteína F4DUD. Como grupo control se han inoculado 5 ratones con el tetrapéptido DUD (4DUD). Se aplicaron 3 inmunizaciones, sin adyuvantes, a los días 0, 15 y 30 del ensayo, y se obtuvieron muestras de sangre de todos los animales, antes de cada inmunización y 15 días después de la última inmunización, si bien los estudios serológicos de la presencia de anticuerpos se realizaron con los sueros tras la segunda inmunización.

De la sangre extraída a cada uno de los grupos de animales que incluyen el ensayo, se aisló el suero y fue analizado mediante ELISA indirecto sobre placas de plástico Maxisorp de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) tapizadas con 500 ng de proteína purificada p54, la cual contiene el epítipo DUD. La proteína se deja adsorber a 4°C durante toda la noche. El análisis se realizó usando 100 uL/pocillo, partiendo de una dilución 1/100 de los sueros y diluciones seriadas a la mitad (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800) con buffer BSA-PBST, compuesto de 2%-BSA (albúmina de suero bovino) en buffer fosfato al 0,1% de Tween 20 (PBST). Las diluciones de los sueros se dejan incuban durante 60 minutos, y posteriormente se lavan los pocillos con 300 uL de PBST. Después, los pocillos se incubaron durante 60 minutos con 100 uL de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) a una dilución 1/2000 (Amersham, UK). Después los pocillos se lavaron con buffer PBST. Para el revelado, se añadieron 100 uL/pocillo de ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) (KPL, EEUU). La reacción de la peroxidasa se deja desarrollar durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se mide la densidad óptica a 405 nm en un lector de ELISA (Multiskan EX, Thermo Electron Corp, EEUU).

En la figura 2 se muestra la presencia de anticuerpos IgG anti-DUD presente en los sueros de los distintos grupos de ratones a día 30, usando una dilución 1/100 de dichos sueros. En dicha figura se pone de manifiesto, que las flagelinas de *Marinobacter*, cuando se inoculan por vía subcutánea, inducen una respuesta inmune humoral frente al epítipo DUD tan potente como lo hace la flagelina STF de *Salmonella typhimurium*, mientras que el péptido 4DUD por sí solo, no es capaz de inducir anticuerpos. Los datos representados en la figura 2 corresponden a las medias aritméticas de todos los animales dentro de cada grupo. Así, la Tabla 1 muestra los máximos y mínimos de densidad óptica media a 405nm para cada grupo de muestras de suero de ratones. Por otro lado, la respuesta de anticuerpos IgG inducida por F4DUD cuando se inocula por vía intranasal (in) es muy buena, aunque ligeramente inferior (en la media aritmética) a la obtenida por vía subcutánea (sc) (figura 2 y tabla 1).

Tabla 1. Medias aritméticas de los valores máximos y mínimos de anticuerpos IgG anti-DUD presente en los sueros de los ratones inmunizados con las flagelinas de fusión FR4DUD, F4DUD STF4DUD y F4FUDin (intranasal).

	Máximo	Mínimo
FR4DUD	2,28	1,63
F4DUD	2,494	2,115
STF4DUD	2,541	2,023
F4DUDin	2,144	1,236

Los sueros de los animales inmunizados con las flagelinas de *Marinobacter* (F4DUD y FR4DUD) y *Salmonella typhimurium* (STF4DUD) tienen anticuerpos IgG anti-4DUD a un título mayor de 1/12800 (figura 3), ya que los valores de densidad óptica de todos los sueros están por encima del punto de corte definido como 3 veces el valor de densidad óptica del tetrapéptido 4DUD (figura 3). Estos datos nos indican que las flagelinas de fusión (con el epítipo DUD) de *Marinobacter*, inducen una respuesta inmune muy potente contra dicho epítipo DUD, sin la ayuda de adyuvantes, llegando a alcanzar títulos de anticuerpos mayores de 1/12800. Estos resultados indican que las flagelinas de *Marinobacter* interactúan de manera apropiada con TLR5, activando el sistema inmune de forma potente, de manera similar a la flagelina de *Salmonella typhimurium*, pero sin tener los posibles perjuicios asociados a dichas flagelinas en aquellos individuos que posean una inmunidad previa a *Salmonella typhimurium*.

**Ejemplo 4. Estudio “in vivo” de capacidad vacunal de la flagelina de fusión de *Marinobacter FR* unida a 4 copias en tándem del epítipo M2-2009.**

En este ejemplo se ha estudiado la capacidad vacunal e inmunogénica “in vivo” de la flagelina FR de *Marinobacter* en fusión transcripcional a 4 copias en tándem del péptido M2-2009 (SEQ ID NO:27) en el extremo 3' (c-terminal) de dicha flagelina FR. La secuencia del péptido M2 corresponde al virus de la gripe de la cepa pandémica A/Castilla-La Mancha/GP13/2009(H1N1) (GenBank: FJ985750), y que en la presente invención se ha denominado 4M2-2009 (SEQ ID NO:27). Esta flagelina FR recombinante se ha obtenido a partir del plásmido pFastbac-FR-4M2-2009 (SEQ ID

NO:29). A partir de este plásmido y mediante digestión con las enzimas de restricción Bam HI y Hind III, se aisló el fragmento de interés que contiene la flagelina de fusión junto con la cola de histidinas y la secuencia KDEL (SEQ ID NO: 29), y se clonó mediante procedimientos estándar (rapid DNA ligation kit, Roche, España) en el vector pRSET-A (Invitrogen, Reino Unido), para dar lugar a un plásmido recombinante pRSETA-FR4M2-2009 (SEQ ID NO:33). Con este plásmido recombinante se transformaron bacterias BL21(DE3)pLysS siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Reino Unido). La expresión de la proteína en estas bacterias transformadas se indujo tras añadir IPTG a una concentración final de 1mM. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad.

Para evaluar la inmunogenicidad de la flagelina recombinante FR-4M2-2009, se inocularon por la vía subcutánea (sc) 4 ratones con 10 ug de dicha flagelina purificada y como grupo control se inocularon 4 ratones con 10 µg del péptido 4M2-2009 en PBS. Se aplicaron 2 inmunizaciones, sin adyuvantes, a los días 0, y 15 del ensayo, y se obtuvieron muestras de sangre de todos los animales, antes de cada inmunización y 15 días después de la última inmunización, si bien los estudios serológicos de la presencia de anticuerpos se realizaron con los sueros tras la segunda inmunización.

De la sangre extraída se aisló el suero y fue analizado mediante ELISA indirecto sobre placas de plástico Maxisorp de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) tapizadas con 500 ng de una proteína carrier que contiene las 4 copias del péptido M2-2009. El ELISA se realizó usando 100 µL/pocillo, partiendo de una dilución 1/100 de los sueros y diluciones seriadas a la mitad (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800) con buffer BSA-PBST, y realizando los pasos explicados previamente.

En la figura 4 se muestra el nivel de anticuerpos IgG anti-4M2-2009 presente en los sueros de los 4 ratones estudiados (R1, R2, R3 y R4). Se observa un título elevado de anticuerpos en los ratones inmunizados con FR-4M2-2009 respecto a los ratones control (C1, C2, C3 y C4), indicando que esta flagelina es funcional y apropiada a la hora de generar una respuesta inmune contra el epítipo 4M2-2009.

#### **Ejemplo 5. Reactividad cruzada entre las flagelinas F y FR de *Marinobacter* y la flagelina STF de *Salmonella*.**

Para el estudio de la reactividad cruzada que pueda existir entre las flagelinas de *Marinobacter* (F y FR) y la flagelina de *Salmonella typhimurium* (STF) (obtenidas mediante el método comercial “Bac-to-Bac® Baculovirus system” (Invitrogen, USA)), se estudiaron todos los sueros de cada grupo de animales inmunizados con las distintas versiones de flagelinas-4DUD. El estudio se realiza después de una pauta estándar de inmunización como se describe en el Ejemplo 2.

##### **5.1. Reactividad cruzada frente la flagelina STF de *Salmonella*.**

Para analizar la reactividad cruzada existente entre la flagelina STF y los anticuerpos anti-flagelinas F de *Marinobacter* y STF de *Salmonella*, como control positivo, se tapizaron placas de cultivo de 96 pocillos, antes mencionadas, con 500 ng de proteína STF purificada previamente mediante cromatografía de afinidad basada en la presencia de la cola de histidinas, como se ha explicado anteriormente. La proteína STF purificada se deja adsorber sobre la placa de cultivo a 4°C durante toda la noche. Para el análisis se estudiaron los sueros de ratones inmunizados con la flagelina STF4DUD (grupo de sueros A), como control positivo, y los sueros de ratones que contenían anticuerpos contra la flagelina F4DUD (grupo de sueros B) (figura 5). Se siguió el procedimiento de ELISA indirecto descrito anteriormente partiendo de los sueros a una dilución 1/100 y haciendo diluciones seriadas a la mitad con el buffer BSA-PBST hasta alcanzar la dilución 1/12800. El resultado (figura 5) muestra que los sueros de animales inmunizados con STF4DUD (grupo de sueros A) contienen gran cantidad de anticuerpos anti-STF que se unen a la proteína purificada STF presente en la placa de cultivo, alcanzando un título mayor de 1/12800. Por su parte, los sueros de ratones inmunizados con F4DUD (grupo de sueros B) presentan una reactividad muy baja frente a la flagelina STF, con excepción del suero B5 que es único que sí presenta reactividad, aunque con niveles de anticuerpos 32 veces menos que los controles positivos (grupo de sueros A). Los títulos de anticuerpos IgG contra la flagelina F (grupo de sueros B) se muestran en la figura 6, donde se aprecia que el suero B5 tiene más título de anticuerpos que el resto de sueros de ese grupo. Sin embargo, la respuesta inducida frente a DUD en cada uno de los ratones de ese grupo fue muy buena (representado en la figura 2). Por tanto, puede haber muy buena inmunidad frente al epítipo que lleva en fusión la flagelina, pero una inmunidad heterogénea frente a la flagelina vacunal.

Estos resultados indican que puede no haber reacción cruzada entre los anticuerpos generados contra la flagelina F de *Marinobacter* y la flagelina STF de *Salmonella typhimurium*, pero que, si existe, es 32 veces menor respecto de un suero muy positivo (mayor de 1/12800).

También se ha ensayado la reacción cruzada entre la flagelina STF de *Salmonella* y los anticuerpos anti-FR (grupo de sueros C) (figura 7), mostrando un comportamiento similar al observado para los anticuerpos anti-F. Sólo uno de los cinco sueros del grupo de ratones inmunizados con la flagelina FR4DUD (grupo de sueros C) presenta más reactividad cruzada frente STF (suero C3), aunque esta reactividad se puede cuantificar en 32 veces menos que los controles positivos a STF. El suero C3 presenta más título de anticuerpos anti-FR (3200>IgG>6400) que el resto de sueros de su grupo (figura 8). Se puede decir que aquellos sueros más positivos de animales inmunizados con la flagelina FR de *Marinobacter* reconocerían en menor medida la flagelina de *Salmonella typhimurium*.

##### **5.2. Reactividad cruzada frente a flagelina F de *Marinobacter*.**

Para analizar la reactividad cruzada existente entre la flagelina F y los anticuerpos anti-flagelinas STF de *Salmonella typhimurium* y F de *Marinobacter*, como control positivo, se realizó el mismo protocolo experimental detallado

anteriormente, tapizándose la placa de cultivo con 500 ng de la flagelina F purificada mediante cromatografía de afinidad. Se analizaron los sueros de ratones que contienen anticuerpos contra la flagelina STF4DUD (grupo de sueros A) y los sueros de ratones que contienen anticuerpos contra la flagelina F4DUD (grupo de sueros B), que servirán como control positivo. El resultado (figura 6) muestra que los sueros de animales inmunizados con F4DUD (grupo de sueros B) reaccionan positivamente al reconocimiento de la flagelina F, y se aprecia que la positividad va disminuyendo con la dilución de los sueros. Por otra parte, los sueros de ratones inmunizados con STF4DUD (grupo de sueros A) presentan una reacción cruzada escasa con la flagelina F de *Marinobacter*, siendo muy débilmente positivos a una dilución 1/100, y teniendo entre 16 y 32 veces menos reactividad que los sueros con anticuerpos anti-flagelina F, que actúan como control positivo. Estos sueros anti-STF que dan esta escasa reactividad son, sin embargo, muy positivos para el reconocimiento de STF (figuras 3 y 5) con títulos IgG anti-STF mayores de 1/12800, y que posiblemente alcancen 1/25600 (figura 5).

### 5.3. Reactividad cruzada frente a flagelina FR de *Marinobacter*.

Para analizar la reactividad cruzada existente entre la flagelina FR y los anticuerpos anti-flagelinas STF de *Salmonella typhimurium* y FR de *Marinobacter*, como control positivo, se realizó el mismo protocolo experimental detallado anteriormente, tapizándose la placa de cultivo con 500 ng de la flagelina FR purificada mediante cromatografía de afinidad. Se estudiaron los sueros de ratones que contienen anticuerpos contra la flagelina FR4DUD (grupo de sueros C) y los sueros de ratones que contienen anticuerpos contra la flagelina STF4DUD (grupo de sueros A). El resultado (figura 8) muestra que los sueros de animales inmunizados con FR4DUD (grupo de sueros C) reaccionan positivamente al reconocimiento de la flagelina FR, y se aprecia que la positividad va disminuyendo con la dilución de los sueros. Por otra parte, los antisueros que reconocen la flagelina STF (grupo de sueros A) (tras la inmunización con STF4DUD), no reconocen prácticamente la flagelina FR, suponiendo entre 64 y 128 veces menos reconocimiento que los sueros positivos con anticuerpos anti-STF, los cuales son muy positivos para la detección de STF (figuras 3 y 5) con títulos IgG anti-STF mayores de 1/12800, y que posiblemente alcancen 1/25600 (figura 5).

### 5.4. Reactividad cruzada frente a flagelina F de los sueros anti-flagelinas F y FR de *Marinobacter*.

Para analizar la reactividad cruzada existente entre ambas flagelinas de *Marinobacter*, se realizó un ELISA utilizando sueros de ratones que contienen anticuerpos anti-flagelinas de *Marinobacter* FR y F, estos últimos como controles positivos. Se tapizaron placas de cultivo de 96 pocillos con 500 ng de la flagelina F purificada mediante cromatografía de afinidad. Se analizaron sueros de ratón que contiene anticuerpos contra la flagelina FR4DUD y sueros de ratón que contienen anticuerpos contra la flagelina F4DUD (control positivo). El resultado (figura 9) muestra que el suero anti-FR (barras enladrilladas) tiene una densidad óptica de 0,838, un poco menor que la obtenida por el control positivo (barras negras) con una densidad óptica de 1,14, siendo estos valores los correspondientes a la dilución 1/100 del suero. El otro suero analizado con anticuerpos anti-F4DUD (barras con líneas negras oblicuas) presenta un valor a dilución 1/100 de densidad óptica de 0.329, lo que indica que no se ha comportado como un buen control positivo, porque aun siendo positivo tiene menos anticuerpos que su homólogo (barras negras, densidad óptica de 1,14).

En resumen, estos resultados indican la flagelina F de *Marinobacter* tiene una reactividad cruzada algo menor, pero considerable, frente a los anticuerpos anti-flagelina FR que respecto a los anticuerpos anti-flagelina F. Esto se puede explicar por la homología de secuencia de aminoácidos entre ambas flagelinas F y FR de *Marinobacter*.

En la presente invención, se han obtenido resultados sobre el reconocimiento muy escaso de la flagelina de *Salmonella typhimurium* (STF) por parte de sueros anti-flagelina F de *Marinobacter* (figura 6) y, en especial, el prácticamente nulo reconocimiento de STF por parte de anticuerpos anti-FR de *Marinobacter*. Estos hechos se podrían explicar por las diferencias de homología de secuencias aminoacídicas entre proteínas. La flagelina de *Salmonella* debe poseer determinantes antigénicos inmunodominantes contra los que se producen anticuerpos, y estos determinantes, o no están presentes en las flagelinas F y FR, o algún cambio de secuencia de aminoácidos no les permite ser reconocidos. Es importante indicar que en la pauta de inmunización contra STF4DUD no han aparecido anticuerpos frente a regiones de interacción con TLR5, puesto que si estos existieran darían positivo en la reactividad frente a sueros anti-F y anti-FR.

La existencia de anticuerpos anti-flagelina de *Salmonella typhimurium* por infecciones previas o por el uso vacunal previo de la flagelina de *Salmonella*, puede inhibir de forma progresiva hasta la anulación total la funcionalidad de vacunas basadas en la flagelina de *Salmonella typhimurium*. En este sentido, la presente invención nos permite concretar la administración de las flagelinas F y FR (preferentemente) vacunales de *Marinobacter* a individuos con gran cantidad de anticuerpos anti-flagelina de *Salmonella* con seguridad de que las flagelinas vacunales de *Marinobacter* no van a ser reconocidas por los anticuerpos preformados contra la flagelina de *Salmonella typhimurium*, generados tras un procedimiento de inmunización con elevadas dosis de flagelina de *Salmonella typhimurium* como el descrito.

Así, individuos de cualquier especie expuestos a *Salmonella typhimurium*, o vacunados con la flagelina de *Salmonella typhimurium*, que presenten cierto título de anticuerpos preformados contra ésta flagelina de *Salmonella*, se podrían vacunar con las flagelinas de *Marinobacter* (F o FR), en pautas de inmunización estándar, con la seguridad de que estas flagelinas vacunales de *Marinobacter* no van a ser reconocidas por los anticuerpos preformados anti-flagelina de *Salmonella typhimurium*. Por otro lado, en aquellos individuos no expuestos a *Salmonella typhimurium* previamente, se podría usar otra estrategia vacunal administrando inicialmente cualquiera de las dos flagelinas de *Marinobacter* (F o FR) y posteriormente administrar otra vacuna basada en la flagelina de *Salmonella*, o viceversa, es decir, administrar la flagelina vacunal de *Salmonella* y posteriormente la flagelina vacunal de *Marinobacter*. Así, se potenciaría el uso de estas vacunas para múltiples antígenos sin restar eficacia por seroneutralización cruzada entre flagelinas. Estos

resultados, por tanto, permiten establecer nuevas estrategias de administración de múltiples vacunas basadas en flagelinas, aplicando únicamente las vacunas de flagelinas de *Marinobacter*, o en conjunción con vacunas de flagelina de *Salmonella*.

## 5 BIBLIOGRAFÍA

1. Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and K. Namba, Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 2003. 424(6949): p. 643-50.
2. Samatey, F.A., et al., Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 2001. 410(6826): p. 331-7.
- 10 3. Stecher, B., et al., Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun*, 2004. 72(7): p. 4138-50.
4. Smith, K.D., et al., Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol*, 2003. 4(12): p. 1247-53.
- 15 5. Rumbo, M., et al., Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett*, 2006. 580(12): p. 2976-84.
6. Rock, F.L., et al., A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(2): p. 588-93.
7. Janssens, S. and R. Beyaert, Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*, 2003. 16(4): p. 637-46.
- 20 8. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2001. 2(8): p. 675-80.
9. Honko, A.N. and S.B. Mizel, Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol Res*, 2005. 33(1): p. 83-101.
- 25 10. Akira, S. and K. Takeda, Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol*, 2004. 327(6): p. 581-9.
11. McDermott, P.F., et al., High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infect Immun*, 2000. 68(10): p. 5525-9.
12. Andersen-Nissen, E., et al., Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(26): p. 9247-52.
- 30 13. Galkin, V.E., et al., Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. *Science*, 2008. 320(5874): p. 382-5.
14. WO2005/070455. Chonnam Nat University; Rhee Joon Haeng; Lee Shee Eun. 4 Agosto 2005.
15. Lee SE, Kim SY, Jeong BC, Kim YR, Bae SJ, Ahn OS, Lee JJ, Song HC, Kim JM, Choy HE, Chung SS, Kweon NM, Rhee JH. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect Immun*. 2006 74(1): pp. 694-702.
- 35 16. Audibert, F.M. and L.D. Lise, Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today*, 1993. 14(6): p. 281-4.
17. Levine, M.M. and M.B. Sztein, Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat Immunol*, 2004. 5(5): p. 460-4.
- 40 18. Pearson, C.M., Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956. 91(1): p. 95-101.
19. Schijns, V.E., Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol*, 2000. 12(4): p. 456-63.
20. Newton, S.M., C.O. Jacob, and B.A. Stocker, Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science*, 1989. 244(4900): p. 70-2.
- 45 21. Ben-Yedidia, T. and R. Arnon, Epitope-based vaccine against influenza. *Expert Rev Vaccines*, 2007. 6(6): p. 939-48.
22. Huleatt, J.W., et al., Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 2008. 26(2): p. 201-14.
- 50 23. Honko, A.N., et al., Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun*, 2006. 74(2): p. 1113-20.

24. Mizel, S.B., et al., Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol*, 2009. 16(1): p. 21-8.
25. Bargieri, D.Y., et al., New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. *Vaccine*, 2008. 26(48): p. 6132-42.
- 5 26. McDonald, W.F., et al., A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *J Infect Dis*, 2007. 195(11): p. 1607-17.
27. Fierer, J. and D.G. Guiney, Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. *J Clin Invest*, 2001. 107(7): p. 775-80.
- 10 28. Wells, J.V., H.H. Fudenberg, and I.R. MacKay, RElation of the human antibody response to flagellin to GM genotype. *J Immunol*, 1971. 107(6): p. 1505-11.
29. Dalby, T., et al., Rapid decay of Salmonella flagella antibodies during human gastroenteritis: a follow up study. *J Microbiol Methods*, 2005. 62(2): p. 233-43.
30. Ben-Yedidia, T. and R. Arnon, Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunol Lett*, 1998. 64(1): p. 9-15.
- 15 31. McDonough, P.L., et al., Interpretations of antibody responses to Salmonella enterica serotype enteritidis gm flagellin in poultry flocks are enhanced by a kinetics-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998. 5(4): p. 550-5.
32. Nempont, C., et al., Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol*, 2008. 181(3): p. 2036-43.
- 20 33. Huu, N.B., et al., *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol*, 1999. 49 Pt 2: p. 367-75.
34. Shieh, W.Y., et al., *Marinobacter lutaensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Luta, Taiwan. *Can J Microbiol*, 2003. 49(4): p. 244-52.
- 25 35. Yoon, J.H., et al., *Marinobacter flavimaris* sp. nov. and *Marinobacter daepoensis* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004. 54(Pt 5): p. 1799-803.
36. Shivaji, S., et al., *Marinobacter maritimus* sp. nov., a psychrotolerant strain isolated from sea water off the subantarctic Kerguelen islands. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005. 55(Pt 4): p. 1453-6.
37. Martin, S., et al., *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003. 53(Pt 5): p. 1383-7.
- 30 38. Gorshkova, N.M., et al., *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003. 53(Pt 6): p. 2073-8.
39. Green, D.H., et al., *Marinobacter algicola* sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006. 56(Pt 3): p. 523-7.
- 35 40. Gomez-Puertas, P., et al., The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 1998. 243(2): p. 461-71.
41. Alonso, C., et al., African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol*, 2001. 75(20): p. 9819-27.
- 40 42. Altschul, S.F., et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(17): p. 3389-402.
43. Altschul, S.F., et al., Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*, 2005. 272(20): p. 5101-9.
44. Larkin, M.A., et al., Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007. 23(21): p. 2947-8.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)  
<120> Uso de flagelinas del género Marinobacter como adyuvantes vacunales  
<130> VALP-07239

10 <160> 33  
<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1  
<211> 1566  
<212> DNA  
<213> Marinobacter algicola (DG893)

20 <220>  
<221> Flagelina F  
<222> (1)..(1566)

<220>  
<221> característica  
25 <222> (1525)..(1545)  
<223> Región que codifica para una cola de histidinas

<220>  
<221> característica  
30 <222> (1553)..(1563)  
<223> Región que codifica para la secuencia KDEL

<400> 1

35

40



ES 2 569 417 T3

atgcctcaga tcatcaacac caatattgcg tcgctgaatg cacagcgaaa cctgaatact 60  
 tcgcaggaag actccaacgt tgccctgcag cgactgtcat cgggctgcg tatcaactcc 120  
 gccaaaggacg acgccgccgg actggccatc tccgagcgat tcacatcgca gatcaaaggt 180  
 ctcaaccagg ccattcgaaa cgccaatgac ggtatttccc tggctcagac cgccgaaggc 240  
 gccctgggcg aatccggaaa catcctgcag cgcatccggg aactcgccgt acagtccgcc 300  
 aacgctacca actccgcatc tgacaggaag gccctgcagt ctgaagtaaa ccagctaaaa 360  
 ggtgagctcg agcgcattgc caccaccacc gaattcaacg gactgaaact tctggacggc 420  
 accttccagg ctcagaagtt ccaggctggc gccaacgaaa accagagcat cgccgtttcc 480  
 atcgaagggtg cccgaaccgc cgacctagca aacaacacgc tcgacgctgc caacgcaacc 540  
 ctgaaccagg gcaccggttc aacaacggca gcgaatgcga cgttaccgc aaaaaacacg 600  
 atcgccacgc agaatctcac catttccagc tcgctggaca gccaggtggt gccattaca 660  
 gcaggtgaca cagcggaaaga catcgccgca gccatcaacg acattggtgc cacgacgggt 720  
 gtgaacgcaa cggcaagaac atcggcgacc ctgagcaaca ccgctaccac gccaatcgcc 780  
 gtgcctcaaa ccgatcgct cacgctttcc aacggtagca gttcagcaac catttccgcg 840  
 cagatcaccg atgcgaacga cctctcagca attgcacgtg aggtgaacgc agcttccggc 900  
 aagaccggca ttaccgcgga agtcgctaac gacggcagca tcacgctgat tcaggagcaa 960  
  
 ggtaaagaca tcaactattga agactttacc gcagcgggct ctcagcaact ggcggtacag 1020  
 ggtagtggcg atccaagtgc catcgaactg acaaacgggtg gtgccaatgc cacacgtatc 1080  
 gccggggaat tgacactgga ctctccggt agcttcgcg cgacgtctga cgccaccctg 1140  
 gccgcaggca gcgttctgaa cagtgcacag aataccgccg ccggctccac acctgaagaa 1200  
 gtggcaggta ttgatataag caccgttgac ggcgcaacca gtgcacttgc agttgtggat 1260  
 gcggcattgg aaaccatcag tggcattcgt gccgatctgg gcgccgcgca gaatcgactc 1320  
 gagtcgacca ttgccaacct gactacgacc tctgagaacc tttcggccgc gcgttcgcga 1380  
 attcgtgatg cagactttgc cgccgaatcc gcggaactcg cccgcacca agtgctccag 1440  
 caggctggct tgtcggatt ggcccaggcc aacgcaagac cgcagcaggt tctgcagctg 1500  
 ctgcaggggtg catgcgggtc tagacatcac caccaccatc accatgctag aaaagatgaa 560  
 ctgtaa 566

<210> 2

<211> 521

<212> PRT

5 <213>Marinobacter algicola (DG893)

<220>

<221> Flagelina F  
 <222> (1)..(521)

5 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (509)..(515)  
 <223> Cola de histidinas

10 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (518)..(521)  
 <223> Secuencia KDEL

15 <400> 2

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

Gln Ser Glu Val Asn Gln Leu Lys Gly Glu Leu Glu Arg Ile Ala Thr  
 115 120 125  
 Thr Thr Glu Phe Asn Gly Leu Lys Leu Leu Asp Gly Thr Phe Gln Ala  
 130 135 140  
 Gln Lys Phe Gln Ala Gly Ala Asn Glu Asn Gln Ser Ile Ala Val Ser  
 145 150 155 160  
 Ile Glu Gly Ala Arg Thr Ala Asp Leu Ala Asn Asn Thr Leu Asp Ala  
 165 170 175  
 Ala Asn Ala Thr Leu Asn Gln Gly Thr Gly Ser Thr Thr Ala Ala Asn  
 180 185 190  
 Ala Thr Leu Pro Ala Gln Asn Thr Ile Ala Thr Gln Asn Leu Thr Ile  
 195 200 205  
 Ser Ser Ser Leu Asp Ser Gln Val Val Pro Ile Thr Ala Gly Asp Thr  
 210 215 220  
 Ala Glu Asp Ile Ala Ala Ala Ile Asn Asp Ile Gly Ala Thr Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ala Thr Ala Arg Thr Ser Ala Thr Leu Ser Asn Thr Ala Thr  
 245 250 255  
 Thr Pro Ile Ala Val Pro Gln Thr Val Ser Leu Thr Leu Ser Asn Gly  
 260 265 270  
 Ser Ser Ser Ala Thr Ile Ser Ala Gln Ile Thr Asp Ala Asn Asp Leu  
 275 280 285  
 Ser Ala Ile Ala Arg Glu Val Asn Ala Ala Ser Gly Lys Thr Gly Ile  
 290 295 300  
 Thr Ala Glu Val Ala Asn Asp Gly Ser Ile Thr Leu Ile Gln Glu Gln  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Asp Ile Thr Ile Glu Asp Phe Thr Ala Ala Gly Ser Gln Gln  
 325 330 335  
 Leu Ala Val Gln Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ala Ile Glu Leu Thr Asn  
 340 345 350  
 Gly Gly Ala Asn Ala Thr Arg Ile Ala Gly Glu Leu Thr Leu Asp Ser  
 355 360 365  
 Ser Val Ser Phe Ala Ala Thr Ser Asp Ala Thr Leu Ala Ala Gly Ser  
 370 375 380  
 Val Leu Asn Ser Ala Gln Asn Thr Ala Ala Gly Ser Thr Pro Glu Glu  
 385 390 395 400  
 Val Ala Gly Ile Asp Ile Ser Thr Val Asp Gly Ala Thr Ser Ala Leu  
 405 410 415  
 Ala Val Val Asp Ala Ala Leu Glu Thr Ile Ser Gly Ile Arg Ala Asp  
 420 425 430  
 Leu Gly Ala Ala Gln Asn Arg Leu Glu Ser Thr Ile Ala Asn Leu Ser  
 435 440 445  
 Thr Thr Ser Glu Asn Leu Ser Ala Ala Arg Ser Arg Ile Arg Asp Ala

ES 2 569 417 T3

	450		455		460														
	Asp	Phe	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Thr	Gln	Val	Leu	Gln			
	465					470					475					480			
	Gln	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Ala	Asn	Ala	Arg	Pro	Gln	Gln			
					485					490					495				
	Val	Leu	Gln	Leu	Leu	Gln	Gly	Ala	Cys	Gly	Ser	Arg	His	His	His	His			
				500					505					510					
	His	His	His	Ala	Arg	Lys	Asp	Glu	Leu										
			515					520											

- <210> 3
- <211> 1557
- <212> DNA
- 5 <213> Marinobacter algicola (DG893)
  
- <220>
- <221> Flagelina FR
- <222> (1)..(1557)
- 10
- <220>
- <221> característica
- <222> (1516)..(1536)
- <223> Región que codifica para una cola de histidinas
- 15
- <220>
- <221> característica
- <222> (1543)..(1554)
- <223> Región que codifica para la secuencia KDEL
- 20
- <400> 3

ES 2 569 417 T3

atggctctcg gtattaacac taacgttgog tcaactgtcag ctcagaacca gctgaacaaa 60  
 tcccaggagc tttctaacca agctctggag cgtctgtctt ccggtctgog catcaactcc 120  
 gccaaaggacg atgctgctgg ccttgcaatt tcgaccogtt ttcagtccca gatctctggt 180  
 ctgaatggtg cccagcgtaa cgccaacgac ggtatttccc tggctcagac tgctgaaggt 240  
 gctctggaag aaaccaccaa catcctgcag cgcacccgtg agctgtctgt tcagtcggcc 300  
 aactctacca actcttcttc cgaccgctct gcacttcagg gcgaagtaaa ccagctgaag 360  
 caagagcttg atcgtattgc cggtagacc cagtttaacg gcctcaacct tctggatggc 420  
 agcttcactg cccagtcatt ccaggttggt gccaacgcta accagaccat ctccggtctct 480  
 gtaactggcg ctctgtggtg cgaccttggg aacaacaccg tatccggtga aagtgatacc 540  
 actgtcagtc agggcacggg ttctgttgca gtcgcgggcc ctgatgtggc aaccgttgcc 600  
 aacaatacga ttgctacaca gaacatcacc gtttctggaa ctgaaggctc tgaggctatc 660  
 ggtattacc ccaggcgatac tgcagaagcg attgcggtctg ctgttaacgc tgaaccggc 720  
 acgactgggtg taacggctac ggcacccacc acggcaacc ccgctgggtct gtctgacgat 780  
 ggtacgggtt cctttacgct tggcagtggt ggcgacacag cgaccatctc cgcagcggta 840  
 acgaccactg acctgggtgc gctggccaaa gcgatcaacg atacctcagg caccactggt 900  
 gttacggctg aagcaaaccg tggcgaaatc aactgaccc aggtgatgg caaagacatc 960  
  
 cgtctgcagg actttgcaa ctcaggtaac gcgaccggta ccgccacgct gcagggcagc 1020  
 ggtgaccat cagcggttac tttgaccgct ggcagcactg acagcacgat tgcttctggc 1080  
 tctgttgaat tcgcctcttc cgggtgcttc tcagtaagct cctctgtcgc agagactgcc 1140  
 ggtagcattc tgaacgtcgc agccgacacc gtggttggtt ccaacctcca gtcagtgtct 1200  
 tctatcgaca tcggtactgt tgcgggctg aacagcgcga tcgagattgc agatgcggct 1260  
 ctggagcaga tcagtggtat ccgcccgat ctgggtgctg cccagaaccg gttcagatct 1320  
 acgatcgcca acctgagcac aactgccgaa aacctgtcgg ccgctaacag ccggattctg 1380  
 gatgcagact tcgcatctga aactgctaag ctgtccaagg cgcaggttct ccagcaagct 1440  
 ggtatctctg tactggcaca ggcgaatgcc cgtccacagc aggttctgtc cctcctgcag 1500  
 gcatgcgggt ctagacatca ccaccaccat caccatgcta gaaagatga actgtaa 1557

<210> 4

<211> 518

<212> PRT

5 <213> *Marinobacter algicola* (DG893)

<220>

<221> Flagelina FR

<222> (1)..(518)

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (506)..(512)  
 <223> Cola de histidinas

5

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (514)..(518)  
 <223> Secuencia KDEL

10

<400> 4

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

Thr Thr Gln Phe Asn Gly Leu Asn Leu Leu Asp Gly Ser Phe Thr Ala  
 130 135 140  
 Gln Ser Phe Gln Val Gly Ala Asn Ala Asn Gln Thr Ile Ser Val Ser  
 145 150 155 160  
 Val Thr Gly Ala Arg Gly Ala Asp Leu Gly Asn Asn Thr Val Ser Gly  
 165 170 175  
 Glu Ser Asp Thr Thr Val Ser Gln Gly Thr Gly Ser Val Ala Val Ala  
 180 185 190  
 Ala Ala Asp Val Ala Thr Val Ala Asn Asn Thr Ile Ala Thr Gln Asn  
 195 200 205  
 Ile Thr Val Ser Gly Thr Glu Gly Ser Glu Val Ile Gly Ile Thr Gln  
 210 215 220  
 Gly Asp Thr Ala Glu Ala Ile Ala Ala Ala Val Asn Ala Glu Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Gly Val Thr Ala Thr Ala Ser Thr Thr Ala Thr Leu Ala Gly  
 245 250 255  
 Leu Ser Asp Asp Gly Thr Val Ser Phe Thr Leu Gly Ser Gly Gly Asp  
 260 265 270  
 Thr Ala Thr Ile Ser Ala Ala Val Thr Thr Thr Asp Leu Gly Ala Leu  
 275 280 285  
 Ala Lys Ala Ile Asn Asp Thr Ser Gly Thr Thr Gly Val Thr Ala Glu  
 290 295 300  
 Ala Asn Gly Gly Glu Ile Thr Leu Thr Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ile  
 305 310 315 320  
 Arg Leu Gln Asp Phe Ala Asn Ser Gly Asn Ala Thr Gly Thr Ala Thr  
 325 330 335  
 Leu Gln Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ala Val Thr Leu Thr Ala Gly Ser  
 340 345 350  
 Thr Asp Ser Thr Ile Ala Ser Gly Ser Val Glu Phe Ala Ser Ser Gly  
 355 360 365  
 Ala Phe Ser Val Ser Ser Ser Val Ala Glu Thr Ala Gly Ser Ile Leu  
 370 375 380  
 Asn Val Ala Ala Asp Thr Val Val Gly Ser Asn Leu Gln Ser Val Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Ile Asp Ile Gly Thr Val Ala Gly Ala Asn Ser Ala Ile Glu Ile  
 405 410 415  
 Ala Asp Ala Ala Leu Glu Gln Ile Ser Gly Ile Arg Ala Asp Leu Gly  
 420 425 430  
 Ala Ala Gln Asn Arg Phe Glu Ser Thr Ile Ala Asn Leu Ser Thr Thr  
 435 440 445  
 Ala Glu Asn Leu Ser Ala Ala Asn Ser Arg Ile Leu Asp Ala Asp Phe  
 450 455 460  
 Ala Ser Glu Thr Ala Lys Leu Ser Lys Ala Gln Val Leu Gln Gln Ala





ES 2 569 417 T3

atgctcaga	tcatcaacac	caatattgcg	tcgctgaatg	cacagcgaaa	cctgaatact	60
tcgcaggaag	actccaacgt	tgcctgcag	cgactgtcat	ccggcctgcg	tatcaactcc	120
gccaaggacg	acgccgccgg	actggccatc	tccgagcgat	tcacatcgca	gatcaaaggt	180
ctcaaccagg	ccattcgaaa	cgccaatgac	ggatattccc	tggctcagac	cgccgaaggc	240
gccctgggcg	aatccggaaa	catcctgcag	cgcattccggg	aactcgccgt	acagtccgcc	300
aacgctacca	actccgcac	tgacaggaag	gccctgcagt	ctgaagtaaa	ccagctaaaa	360
ggtgagctcg	agcgcattgc	caccaccacc	gaattcaacg	gactgaaact	tctggacggc	420

ES 2 569 417 T3

```

accttccagg ctcagaagtt ccaggctggc gccaacgaaa accagagcat cgccgtttcc 480
atcgaaggtg cccgaaccgc cgacctagca aacaacacgc tcgacgctgc caacgcaacc 540
ctgaaccagg gcaccgggtc aacaacggca gcgaatgcga cgttacccgc acaaaacacg 600
atcgccacgc agaattctcac catttccagc tcgctggaca gccagggtgt gccattaca 660
gcaggtgaca cagcgggaaga catcgccgca gccatcaacg acattgggtgc cacgacgggt 720
gtgaacgcaa cggcaagaac atcggcgacc ctgagcaaca ccgctaccac gccaatcgcc 780
gtgcctcaaa ccgtatcgct cacgctttcc aacggtagca gttcagcaac catttccgcg 840
cagatcaccg atgcgaacga cctctcagca attgcacgtg aggtgaacgc agcttccggc 900
aagaccggca ttaccgcgga agtcgctaac gacggcagca tcacgctgat tcaggagcaa 960
ggtaaagaca tcactattga agactttacc gcagcgggct ctgagcaact ggcggtacag 1020
ggtagtggcg atccaagtgc catcgaactg acaaacgggtg gtgccaatgc cacacgtatc 1080
gccggggaat tgacactgga ctctccggtt agcttcgcgg cgacgtctga cgccaccctg 1140
gccgcaggca gcgttctgaa cagtgcacag aataccgccg ccggctccac acctgaagaa 1200
gtggcaggta ttgatataag caccgttgac ggcgcaacca gtgcacttgc agttgtggat 1260
gcggcattgg aaaccatcag tggcattcgt gccgatctgg gcgcccgcga gaatcgactc 1320
gagtcgacca ttgccaacct gagtacgacc tctgagaacc tttcggccgc gcgttcgca 1380
attcgtgatg cagactttgc cgccgaatcc gcggaactcg cccgcacca agtgctccag 1440
caggctggct tgtcgggtatt ggcccaggcc aacgcaagac cgcagcaggt tctgcagctg 1500
ctgcagggtg catgccatcc gactgagcct tacacgacag tcactactca gaactgtct 1560
tcacaaacaa tgtcggctat tgaaaattta ggtaccatc cgactgagcc ttacacgaca 1620
gtcactactc agaaactgc ttcacaaaca atgtcggcta ttgaaaattt agctagccat 1680
ccgactgagc cttacacgac agtcactact cagaactctg cttcaciaac aatgtcggct 1740
attgaaaatt tactcgagca tccgactgag cttacacga cagtcactac tcagaact 1800
gcttcacaaa caatgtcggc tattgaaaat ttacaccatc accatcacca tcaccatcac 1860
cattctagaa aagatgaact gtaa 1884

```

<210> 6

<211> 626

<212> PRT

5 <213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>

<221> Flagelina F4DUD

<222> (1)..(626)

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA

<222> (506)..(530)

<223> Epítopo DUD

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
5 <222> (533)..(557)  
<223> Epítopo DUD

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
10 <222> (560)..(584)  
<223> Epítopo DUD

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
15 <222> (587)..(611)  
<223> Epítopo DUD

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
20 <222> (612)..(621)  
<223> Cola de histidinas

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
25 <222> (624)..(627)  
<223> Secuencia KDEL

<400> 6

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

Ser Ser Leu Asp Ser Gln Val Val Pro Ile Thr Ala Gly Asp Thr Ala  
 210 215 220  
 Glu Asp Ile Ala Ala Ala Ile Asn Asp Ile Gly Ala Thr Thr Gly Val  
 225 230 235 240  
 Asn Ala Thr Ala Arg Thr Ser Ala Thr Leu Ser Asn Thr Ala Thr Thr  
 245 250 255  
 Pro Ile Ala Val Pro Gln Thr Val Ser Leu Thr Leu Ser Asn Gly Ser  
 260 265 270  
 Ser Ser Ala Thr Ile Ser Ala Gln Ile Thr Asp Ala Asn Asp Leu Ser  
 275 280 285  
 Ala Ile Ala Arg Glu Val Asn Ala Ala Ser Gly Lys Thr Gly Ile Thr  
 290 295 300  
 Ala Glu Val Ala Asn Asp Gly Ser Ile Thr Leu Ile Gln Glu Gln Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Asp Ile Thr Ile Glu Asp Phe Thr Ala Ala Gly Ser Gln Gln Leu  
 325 330 335  
 Ala Val Gln Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ala Ile Glu Leu Thr Asn Gly  
 340 345 350  
 Gly Ala Asn Ala Thr Arg Ile Ala Gly Glu Leu Thr Leu Asp Ser Ser  
 355 360 365  
 Val Ser Phe Ala Ala Thr Ser Asp Ala Thr Leu Ala Ala Gly Ser Val  
 370 375 380  
 Leu Asn Ser Ala Gln Asn Thr Ala Ala Gly Ser Thr Pro Glu Glu Val  
 385 390 395 400  
 Ala Gly Ile Asp Ile Ser Thr Val Asp Gly Ala Thr Ser Ala Leu Ala  
 405 410 415  
 Val Val Asp Ala Ala Leu Glu Thr Ile Ser Gly Ile Arg Ala Asp Leu  
 420 425 430  
 Gly Ala Ala Gln Asn Arg Leu Glu Ser Thr Ile Ala Asn Leu Ser Thr  
 435 440 445  
 Thr Ser Glu Asn Leu Ser Ala Ala Arg Ser Arg Ile Arg Asp Ala Asp  
 450 455 460  
 Phe Ala Ala Glu Ser Ala Glu Leu Ala Arg Thr Gln Val Leu Gln Gln  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Leu Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Ala Arg Pro Gln Gln Val  
 485 490 495  
 Leu Gln Leu Leu Gln Gly Ala Cys His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr Thr  
 500 505 510  
 Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser Ala Ile Glu Asn  
 515 520 525  
 Leu Gly Thr His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn  
 530 535 540

```

Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser Ala Ile Glu Asn Leu Ala Ser His Pro
545                               550                               555                               560

Thr Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr
                               565                               570                               575

Met Ser Ala Ile Glu Asn Leu Leu Glu His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr
                               580                               585                               590

Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser Ala Ile Glu
                               595                               600                               605

Asn Leu His His His His His His His His His His Ser Arg Lys Asp
        610                               615                               620

Glu Leu
625

```

- <210> 7
- <211> 1875
- 5 <212> DNA
- <213> Marinobacter algicola (DG893)
  
- <220>
- <221> Flagelina FR4DUD
- 10 <222> (1)..(1875)
  
- <220>
- <221> característica
- <222> (1507)..(1581)
- 15 <223> Epítopo DUD
  
- <220>
- <221> característica
- <222> (1588)..(1662)
- 20 <223> Epítopo DUD
  
- <220>
- <221> característica
- <222> (1669)..(1743)
- 25 <223> Epítopo DUD
  
- <220>
- <221> característica
- <222> (1750)..(1824)
- 30 <223> Epítopo DUD
  
- <220>
- <221> característica
- <222> (1825)..(1854)
- 35 <223> Secuencia que codifica para una cola de histidinas
  
- <220>
- <221> característica
- <222> (1861)..(1872)
- 40 <223> Secuencia que codifica para la secuencia KDEL
  
- <400> 7

ES 2 569 417 T3

atggctctcg gtattaacac taacggtgcg tcaactgacag ctcagaacca gctgaacaaa 60  
tcccaggagc tttctaacca agctctggag cgtctgtctt ccggtctgcg catcaactcc 120  
gccaaggacg atgctgctgg ccttgcaatt tcgaccggtt ttcagtcca gatctctggt 180

ES 2 569 417 T3

ctgaatggtg cccagcgtaa cgccaacgac ggtatttccc tggtcagac tgctgaaggt 240  
gctctggaag aaaccaccaa catcctgcag cgcacccgtg agctgtctgt tcagtcggcc 300  
aactctacca actcttcttc cgaccgctct gcacttcagg gcgaagtaaa ccagctgaag 360  
caagagcttg atcgtattgc cggtagacc cagtttaacg gcctcaacct tctggatggc 420  
agcttcactg cccagtcatt ccaggttggg gccaacgcta accagaccat ctccgtctct 480  
gtaactggcg ctctgtgtgc cgaccttggg aacaacaccg tatccgggtga aagtataacc 540  
actgtcagtc agggcaccggg ttctgttgca gtccggggccg ctgatgtggc aaccgttgcc 600  
aacaatacga ttgctacaca gaacatcacc gtttctggaa ctgaaggctc tgaggctcctc 660  
ggtattacc caggcgatc tgcagaagcg attgcccgtg ctgttaacgc tgaaacccggc 720  
acgactgggtg taacggctac ggcatccacc acggcaacc cccgtgtctc gtctgacgat 780  
ggtacgggtt cctttacgct tggcagtggt ggcgacacag cgaccatctc cgcagcggta 840  
acgaccactg acctgggtgc gctggccaaa gcgatcaacg atacctcagg caccactggg 900  
gttagcggctg aagcaaaccg tggcgaaatc aactgacc caggctgatgg caaagacatc 960  
cgtctgcagg actttgcaa ctccaggtaac gcgaccggta cccccacgct gcagggcagc 1020  
ggtgaccat cagcgggtac ttgaccgct ggcagcactg acagcacgat tgcttctggc 1080  
tctgttgaat tcgctcttc cgggtcattc tcagtaagct cctctgtcgc agagactgcc 1140  
ggtagcattc tgaacgtcgc agccgacacc gtggttgggt ccaacctcca gtcagtgtct 1200  
tctatcgaca tcggtactgt tgcgggctc aacagcgc aaagattgc agatgcccgt 1260  
ctggagcaga tcagtggtat cccgcccgat ctgggtgctg cccagaaccg gttcagatct 1320  
acgatcgcca acctgagcac aactgccgaa aacctgtcgg ccgctaacag cccgattctg 1380  
gatgcagact tcgcatctga aactgctaag ctgtccaagg cgcaggttct ccagcaagct 1440  
ggtatctctg tactggcaca ggcgaatgcc cgtccacagc aggttctgtc cctcctgcag 1500  
caattccatc cgactgagcc ttacacgaca gtcactactc agaactgc ttcacaaaca 1560  
atgtcggcta ttgaaaattt aggtaccat cccactgagc cttacacgac agtcactact 1620  
cagaactctg cttcacaac aatgtcggct attgaaaatt tagctagcca tccgactgag 1680  
ccttacacga cagtcactac tcagaact gcttcacaaa caatgtcggc tattgaaaat 1740  
ttactcgagc atccgactga gccttacag acagtcacta ctcagaacac tgcttcacaa 1800  
acaatgtcgg ctattgaaaa ttacaccat caccatcacc atcaccatca ccattctaga 1860  
aaagatgaac tgtaa 1875

<210> 8  
<211> 624  
<212> PRT



<213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>  
<221> Flagelina FR4DUD  
5 <222> (1)..(624)

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
10 <222> (503)..(527)  
<223> Epítopo DUD

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
15 <222> (530)..(554)  
<223> Epítopo DUD

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
20 <222> (557)..(581)  
<223> Epítopo DUD

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
25 <222> (584)..(608)  
<223> Epítopo DUD

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
30 <222> (609)..(618)  
<223> Cola de histidinas

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
35 <222> (621)..(624)  
<223> Secuencia KDEL

<400> 8

Met Ala Leu Gly Ile Asn Thr Asn Val Ala Ser Leu Ser Ala Gln Asn  
1 5 10 15

Gln Leu Asn Lys Ser Gln Glu Leu Ser Asn Gln Ala Leu Glu Arg Leu  
20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Leu  
35 40 45

Ala Ile Ser Thr Arg Phe Gln Ser Gln Ile Ser Gly Leu Asn Val Ala  
50 55 60

Gln Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Leu Ala Gln Thr Ala Glu Gly  
65 70 75 80

Ala Leu Glu Glu Thr Thr Asn Ile Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Ser  
85 90 95

Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu  
100 105 110

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

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

Gln Ser Phe Gln Val Gly Ala Asn Ala Asn Gln Thr Ile Ser Val Ser  
145 150 155 160

Val Thr Gly Ala Arg Gly Ala Asp Leu Gly Asn Asn Thr Val Ser Gly  
 165 170 175  
 Glu Ser Asp Thr Thr Val Ser Gln Gly Thr Gly Ser Val Ala Val Ala  
 180 185 190  
 Ala Ala Asp Val Ala Thr Val Ala Asn Asn Thr Ile Ala Thr Gln Asn  
 195 200 205  
 Ile Thr Val Ser Gly Thr Glu Gly Ser Glu Val Ile Gly Ile Thr Gln  
 210 215 220  
 Gly Asp Thr Ala Glu Ala Ile Ala Ala Val Asn Ala Glu Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Gly Val Thr Ala Thr Ala Ser Thr Thr Ala Thr Leu Ala Gly  
 245 250 255  
 Leu Ser Asp Asp Gly Thr Val Ser Phe Thr Leu Gly Ser Gly Gly Asp  
 260 265 270  
 Thr Ala Thr Ile Ser Ala Ala Val Thr Thr Thr Asp Leu Gly Ala Leu  
 275 280 285  
 Ala Lys Ala Ile Asn Asp Thr Ser Gly Thr Thr Gly Val Thr Ala Glu  
 290 295 300  
 Ala Asn Gly Gly Glu Ile Thr Leu Thr Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ile  
 305 310 315 320  
 Arg Leu Gln Asp Phe Ala Asn Ser Gly Asn Ala Thr Gly Thr Ala Thr  
 325 330 335  
 Leu Gln Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ala Val Thr Leu Thr Ala Gly Ser  
 340 345 350  
 Thr Asp Ser Thr Ile Ala Ser Gly Ser Val Glu Phe Ala Ser Ser Gly  
 355 360 365  
 Ala Phe Ser Val Ser Ser Ser Val Ala Glu Thr Ala Gly Ser Ile Leu  
 370 375 380  
 Asn Val Ala Ala Asp Thr Val Val Gly Ser Asn Leu Gln Ser Val Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Ile Asp Ile Gly Thr Val Ala Gly Ala Asn Ser Ala Ile Glu Ile  
 405 410 415  
 Ala Asp Ala Ala Leu Glu Gln Ile Ser Gly Ile Arg Ala Asp Leu Gly  
 420 425 430  
 Ala Ala Gln Asn Arg Phe Glu Ser Thr Ile Ala Asn Leu Ser Thr Thr  
 435 440 445  
 Ala Glu Asn Leu Ser Ala Ala Asn Ser Arg Ile Leu Asp Ala Asp Phe  
 450 455 460  
 Ala Ser Glu Thr Ala Lys Leu Ser Lys Ala Gln Val Leu Gln Gln Ala  
 465 470 475 480  
 Gly Ile Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Ala Arg Pro Gln Gln Val Leu  
 485 490 495  
 Ser Leu Leu Gln Gln Phe His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr  
 500 505 510



ES 2 569 417 T3

atggcacaag taatcaaac taacagtctg tctctgctga cccagaataa cctgaacaaa 60  
tcccagtccg cactgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ctggtctgcg tatcaacagc 120  
gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt tcaccgcgaa catcaaaggt 180  
ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgagac cactgaaggc 240  
gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgctg aactggcggt tcagtctgct 300  
aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360  
aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgagc 420  
gacaacaccc tgaccatcca ggttggcgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 480  
aagcagatca actctcagac cctgggtctg gactcactga acgtgcagaa agcgtatgat 540  
gtgaaagata cagcagtaac aacgaaagct tatgccata atggtactac actggatgta 600  
tcgggtcttg atgatgcagc tattaagcg gctacgggtg gtacgaatgg tacggcttct 660  
gtaaccggtg gtgcggttaa atttgacgca gataataaca agtactttgt tactattggt 720  
ggctttactg gtgctgatgc cgccaaaat ggcgattatg aagttaacgt tgctactgac 780  
ggtacagtaa cccttgcggc tggcgcaact aagaccacaa tgcctgctgg tgcgacaact 840  
aaaacagaag tacaggagtt aaaagataca ccggcagttg tttcagcaga tgctaaaaat 900  
gccttaattg ctggcggcgt tgacgctacc gatgctaatt gcgctgagtt ggtcaaatg 960  
tcttataccg ataaaaatgg taagacaatt gaaggcgggt atgcgcttaa agctggcgat 1020  
aagtattacg ccgcagatta cgatgaagcg acaggagcaa ttaaagctaa aaccacaagt 1080  
tatactgctg ctgacggcac taccaaaaca gcggctaacc aactgggtgg cgtagacggt 1140  
aaaaccgaag tcgttactat cgacggtaaa acctacaatg ccagcaaagc cgctggctcat 1200  
gatttcaaag cacaaccaga gctggcggaa gcagccgcta aaaccaccga aaaccgctg 1260  
cagaaaattg atgccgcgct ggcgcagggt gatgcgctgc gctctgatct ggggtgcggt 1320  
caaaaccggt tcaactctgc tatcaccaac ctgggcaata ccgtaacaa tctgtctgaa 1380  
gcgctagacc gtatcgaaga ttccgactac gcgaccgaag tttccaacat gtctcgcgcg 1440  
cagattctgc agcaggccgg tacttccggt ctggcgcagg ctaaccaggt cccgcagaac 1500  
gtgctgtctc tgttacgtga attccatccg actgagcctt acacgacagt cactactcag 1560  
aacactgctt cacaacaat gtcggctatt gaaaatttag gtacccatcc gactgagcct 1620  
tacacgacag tcactactca gaacactgct tcacaaacaa tgtcggctat tgaaaattta 1680  
gctagccatc cgactgagcc ttacacgaca gtcactactc agaacactgc ttcacaaaca 1740  
atgtcggcta ttgaaaattt actcgagcat ccgactgagc cttacacgac agtcactact 1800  
cagaacactg cttcacaac aatgtcggct attgaaaatt tacaccatca ccatcaccat 1860  
caccatcacc attctagaaa agatgaactg taa 1893

<210> 10  
<211> 630  
<212> PRT  
<213> Salmonella typhimurium

5

<220>  
<221> Flagelina STF4DUD  
<222> (1)..(630)

10

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (509)..(533)  
<223> Epítopo DUD

15

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (536)..(560)  
<223> Epítopo DUD

20

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (563)..(587)  
<223> Epítopo DUD

25

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (590)..(614)  
<223> Epítopo DUD

30

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (615)..(624)  
<223> Cola de histidinas

35

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (627)..(630)  
<223> Secuencia KDEL

40

<400> 10

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

Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Ser Leu Asn Val Gln  
 165 170 175  
 Lys Ala Tyr Asp Val Lys Asp Thr Ala Val Thr Thr Lys Ala Tyr Ala  
 180 185 190  
 Asn Asn Gly Thr Thr Leu Asp Val Ser Gly Leu Asp Asp Ala Ala Ile  
 195 200 205  
 Lys Ala Ala Thr Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ala Ser Val Thr Gly Gly  
 210 215 220  
 Ala Val Lys Phe Asp Ala Asp Asn Asn Lys Tyr Phe Val Thr Ile Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Phe Thr Gly Ala Asp Ala Ala Lys Asn Gly Asp Tyr Glu Val Asn  
 245 250 255  
 Val Ala Thr Asp Gly Thr Val Thr Leu Ala Ala Gly Ala Thr Lys Thr  
 260 265 270  
 Thr Met Pro Ala Gly Ala Thr Thr Lys Thr Glu Val Gln Glu Leu Lys  
 275 280 285  
 Asp Thr Pro Ala Val Val Ser Ala Asp Ala Lys Asn Ala Leu Ile Ala  
 290 295 300  
 Gly Gly Val Asp Ala Thr Asp Ala Asn Gly Ala Glu Leu Val Lys Met  
 305 310 315 320  
 Ser Tyr Thr Asp Lys Asn Gly Lys Thr Ile Glu Gly Gly Tyr Ala Leu  
 325 330 335  
 Lys Ala Gly Asp Lys Tyr Tyr Ala Ala Asp Tyr Asp Glu Ala Thr Gly  
 340 345 350  
 Ala Ile Lys Ala Lys Thr Thr Ser Tyr Thr Ala Ala Asp Gly Thr Thr  
 355 360 365  
 Lys Thr Ala Ala Asn Gln Leu Gly Gly Val Asp Gly Lys Thr Glu Val  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Asp Gly Lys Thr Tyr Asn Ala Ser Lys Ala Ala Gly His  
 385 390 395 400  
 Asp Phe Lys Ala Gln Pro Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala  
 420 425 430  
 Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile  
 435 440 445  
 Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg  
 450 455 460  
 Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala  
 465 470 475 480  
 Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln  
 485 490 495



Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg Glu Phe His Pro Thr Glu  
 500 505 510  
 Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser  
 515 520 525  
 Ala Ile Glu Asn Leu Gly Thr His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr Thr Val  
 530 535 540  
 Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser Ala Ile Glu Asn Leu  
 545 550 555 560  
 Ala Ser His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr  
 565 570 575  
 Ala Ser Gln Thr Met Ser Ala Ile Glu Asn Leu Leu Glu His Pro Thr  
 580 585 590  
 Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met  
 595 600 605  
 Ser Ala Ile Glu Asn Leu His His His His His His His His His His  
 610 615 620  
 Ser Arg Lys Asp Glu Leu  
 625 630

- <210> 11
- <211> 29
- <212> DNA
- 5 <213> Salmonella typhimurium
  
- <220>
- <221> característica
- <223> Cebador 5´ de la flagelina STF
- 10
- <400> 11
- gccg gatcca tggcacaagt aatcaacac 29
  
- <210> 12
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Salmonella typhimurium
  
- <220>
- <221> característica
- <223> Cebador 3´ de la flagelina STF
- 20
- <400> 12
- gcggaattca cgtaacagag acagcac 27
- 25
- <210> 13
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Virus de la peste porcina africana (PPA)
- 30
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA
- <222> (1)..(13)

ES 2 569 417 T3

<223> Dominio de unión de la proteína p54 a la dineína DCL8

<400> 13

**Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr**  
**1 5 10**

5 <210> 14  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Virus de la peste porcina africana (PPA)

10 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (1)..(25)  
<223> Péptido modificado de la zona de unión de la proteína p54 a dineína (DUD modificado)

15 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (1)..(5)  
<223> Secuencia de aminoácidos añadidos en el extremo 5´

20 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (19)..(5)  
<223> Secuencia de aminoácidos añadidos en el extremo 3´

25 <400> 14

**His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser**  
**1 5 10 15**  
**Gln Thr Met Ser Ala Ile Glu Asn Leu**  
**20 25**

30 <210> 5  
<211> 495  
<212> PRT  
<213> Salmonella typhimurium

35 <220>  
<221> Flagelina STF  
<222> (1)..(495)

<400> 15

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

ES 2 569 417 T3

115		120		125
Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu	130	135		140
Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu	145	150		155
Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln	165		170	175
Gln Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala	180		185	190
Asp Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr	195		200	205
Gly Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp	210		215	220
Asp Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr	225		230	235
Gly Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu	245		250	255
Val Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro	260		265	270
Ala Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp	275		280	285
Leu Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr	290		295	300
Ala Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile	305		310	315
Asp Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr	325		330	335
Gln Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala	340		345	350
Asp Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp	355		360	365
Gly Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser	370		375	380
Lys Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala	385		390	395
Ala Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu	405		410	415
Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg	420		425	430
Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr	435		440	445
Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser	450		455	460

**Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu**  
**465 470 475 480**

**Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg**  
**485 490 495**

<210> 16  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>  
 <221> Secuencia de interacción de la flagelina FR con TLR5  
 <222> (1)..(15)  
 10 <400> 16

**Asn Ile Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Ser Val Gln Ser Ala Asn**  
**1 5 10 15**

15 <210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Marinobacter algicola (DG893)

20 <220>  
 <221> Secuencia de interacción de la flagelina F con TLR5  
 <222> (1)..(15)  
 <400> 17

**Asn Ile Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn**  
**1 5 10 15**

25 <210> 18  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 30 <213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>  
 <221> Secuencia ampliada de interacción de la flagelina F con TLR5  
 <222> (1)..(17)  
 35 <400> 18

**Asn Ile Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ala**  
**1 5 10 15**

**Thr**

40 <210> 19  
 <211> 1512  
 <212> DNA  
 <213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>  
 <221> Flagelina F  
 <222> (1)..(1512)  
 45 <400> 19

ES 2 569 417 T3

atgcctcaga tcatcaacac caatattgcg tcgctgaatg cacagcgaaa cctgaatact 60  
 tcgcaggaag actccaacgt tgcctgagcag cgactgtcat cggcctgag tatcaactcc 120  
 gccaggacg acgcccggg actggccatc tccgagcgat tcacatcgca gatcaaaggt 180  
 ctcaaccagg ccattcgaaa cgccaatgac ggtatttccc tggctcagac cgccgaaggc 240  
 gccctgggag aatccggaaa catcctgagc cgcatccggg aactcgccgt acagtccgcc 300  
 aacgctacca actccgcatc tgacaggaag gccctgcagt ctgaagtaaa ccagctaaaa 360  
 ggtgagctcg agcgcattgc caccaccacc gaattcaacg gactgaaact tctggacggc 420  
 accttcagg ctcagaagtt ccaggctggc gccaacgaaa accagagcat cgccgtttcc 480  
 atcgaaggtg cccgaaccgc cgacctagca aacaacacgc tcgacgctgc caacgcaacc 540  
 ctgaaccagg gcaccggttc aacaacggca gcgaatgcga cgttaccgc acaaacacg 600  
 atgccacgc agaattctac catttccagc tcgctggaca gccaggtggg gccattaca 660  
 gcaggtgaca cagcgggaaga catcgccgca gccatcaacg acattggtgc cacgacgggt 720  
 gtgaacgcaa cggcaagaac atcggcgacc ctgagcaaca ccgctaccac gccaatcgcc 780  
 gtgcctcaaa ccgtatcgt cacgctttcc aacggtagca gttcagcaac catttccgcg 840  
 cagatcaccg atgcgaacga cctctcagca attgcacgtg aggtgaacgc agcttccggc 900  
 aagaccggca ttaccgaggc agtcgctaac gacggcagca tcacgctgat tcaggagcaa 960  
 ggtaaagaca tcaactattga agactttacc gcagcgggct ctcagcaact ggcggtacag 1020  
 ggtagtggcg atccaagtgc catcgaactg acaaacgggtg gtgccaatgc cacacgtatc 1080  
 gccggggaat tgacactgga ctctccggtt agcttcgagc cgacgtctga cgccaccctg 1140  
 gccgcaggca gcgttctgaa cagtgcacag aataccggcg ccggctccac acctgaagaa 1200  
 gtggcaggta ttgatataag caccggtgac ggcgcaacca gtgcacttgc agttgtggat 1260  
 gcggcattgg aaaccatcag tggcattcgt gccgatctgg gcgccgagca gaatcgactc 1320  
 gaggcgacca ttgccaacct gagtacgacc tctgagaacc tttcggccgc gcgttcgaga 1380  
 attcgtgatg cagactttgc cgccgaatcc gcggaactcg cccgcacca agtgctccag 1440  
 caggctggct tgtcggattt ggcccaggcc aacgcaagac cgcagcaggt tctgcagctg 1500  
 ctgcagggtt aa 1512

<210> 20

<211> 503

<212> PRT

<213> Marinobacter algicola (DG893)

5

ES 2 569 417 T3

<220>

<221> Flagelina F

<222> (1)..(503)

5 <400> 20

<b>Met</b>	<b>Pro</b>	<b>Gln</b>	<b>Ile</b>	<b>Ile</b>	<b>Asn</b>	<b>Thr</b>	<b>Asn</b>	<b>Ile</b>	<b>Ala</b>	<b>Ser</b>	<b>Leu</b>	<b>Asn</b>	<b>Ala</b>	<b>Gln</b>	<b>Arg</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	
<b>Asn</b>	<b>Leu</b>	<b>Asn</b>	<b>Thr</b>	<b>Ser</b>	<b>Gln</b>	<b>Glu</b>	<b>Asp</b>	<b>Ser</b>	<b>Asn</b>	<b>Val</b>	<b>Ala</b>	<b>Leu</b>	<b>Gln</b>	<b>Arg</b>	<b>Leu</b>
			<b>20</b>					<b>25</b>					<b>30</b>		

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Leu  
35 40 45

Ala Ile Ser Glu Arg Phe Thr Ser Gln Ile Lys Gly Leu Asn Gln Ala  
50 55 60

Ile Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Leu Ala Gln Thr Ala Glu Gly  
65 70 75 80

Ala Leu Gly Glu Ser Gly Asn Ile Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Ala  
85 90 95

Val Gln Ser Ala Asn Ala Thr Asn Ser Ala Ser Asp Arg Lys Ala Leu  
100 105 110

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

Thr Thr Glu Phe Asn Gly Leu Lys Leu Leu Asp Gly Thr Phe Gln Ala  
130 135 140

Gln Lys Phe Gln Ala Gly Ala Asn Glu Asn Gln Ser Ile Ala Val Ser  
145 150 155 160

Ile Glu Gly Ala Arg Thr Ala Asp Leu Ala Asn Asn Thr Leu Asp Ala  
165 170 175

Ala Asn Ala Thr Leu Asn Gln Gly Thr Gly Ser Thr Thr Ala Ala Asn  
180 185 190

Ala Thr Leu Pro Ala Gln Asn Thr Ile Ala Thr Gln Asn Leu Thr Ile  
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Asp Ser Gln Val Val Pro Ile Thr Ala Gly Asp Thr  
210 215 220

Ala Glu Asp Ile Ala Ala Ala Ile Asn Asp Ile Gly Ala Thr Thr Gly  
225 230 235 240

Val Asn Ala Thr Ala Arg Thr Ser Ala Thr Leu Ser Asn Thr Ala Thr  
245 250 255

Thr Pro Ile Ala Val Pro Gln Thr Val Ser Leu Thr Leu Ser Asn Gly  
260 265 270

Ser Ser Ser Ala Thr Ile Ser Ala Gln Ile Thr Asp Ala Asn Asp Leu  
275 280 285

Ser Ala Ile Ala Arg Glu Val Asn Ala Ala Ser Gly Lys Thr Gly Ile  
290 295 300

Thr Ala Glu Val Ala Asn Asp Gly Ser Ile Thr Leu Ile Gln Glu Gln  
305 310 315 320

Gly Lys Asp Ile Thr Ile Glu Asp Phe Thr Ala Ala Gly Ser Gln Gln  
325 330 335

Leu Ala Val Gln Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ala Ile Glu Leu Thr Asn  
340 345 350

Gly Gly Ala Asn Ala Thr Arg Ile Ala Gly Glu Leu Thr Leu Asp Ser  
355 360 365

Ser Val Ser Phe Ala Ala Thr Ser Asp Ala Thr Leu Ala Ala Gly Ser



370		375		380																
Val	Leu	Asn	Ser	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Pro	Glu	Glu					
385					390					395					400					
Val	Ala	Gly	Ile	Asp	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Leu					
				405					410					415						
Ala	Val	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Thr	Ile	Ser	Gly	Ile	Arg	Ala	Asp					
			420					425					430							
Leu	Gly	Ala	Ala	Gln	Asn	Arg	Leu	Glu	Ser	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Ser					
		435					440					445								
Thr	Thr	Ser	Glu	Asn	Leu	Ser	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg	Ile	Arg	Asp	Ala					
	450					455					460									
Asp	Phe	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Thr	Gln	Val	Leu	Gln					
465					470					475					480					
Gln	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Ala	Asn	Ala	Arg	Pro	Gln	Gln					
				485					490					495						
Val	Leu	Gln	Leu	Leu	Gln	Gly														
				500																

<210> 21  
 <211> 1503  
 5 <212> DNA  
 <213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>  
 <221> Flagelina FR  
 10 <222> (1)..(1503)

<400> 21

ES 2 569 417 T3

atggctctcg gtattaacac taacgttgcg tcaactgtcag ctcagaacca gctgaacaaa 60  
 tcccaggagc tttctaacca agctctggag cgtctgtctt ccggtctgcg catcaactcc 120  
 gccaaaggacg atgctgctgg ccttgcaatt tcgacccggt ttcagtocca gatctctggt 180  
 ctgaatggtg cccagcgtaa cgccaacgac ggtatattccc tggctcagac tgctgaaggt 240  
 gctctggaag aaaccaccaa catcctgcag cgcacccgtg agctgtctgt tcagtcggcc 300  
 aactctacca actcttcttc cgaccgctct gcacttcagc gcgaagtaaa ccagctgaag 360  
 caagagcttg atcgtattgc cggtaaccacc cagtttaacg gcctcaacct tctggatggc 420  
 agcttcactg cccagtcatt ccaggttggt gccaacgcta accagaccat ctccggtctct 480  
 gtaactggcg ctctgtgtgc cgaccttggt aacaacaccg tatccggtga aagtgatacc 540  
 actgtcagtc agggcacggg ttctgttgca gtcgcggccg ctgatgtggc aaccggtgcc 600  
 aacaatacga ttgctacaca gaacatcacc gtttctggaa ctgaaggctc tgaggctatc 660  
 ggtattacc agggcgatac tgcagaagcg attgcccgtg ctgttaacgc tgaaaccggc 720  
 acgactgggtg taacggctac ggcacccacc acggcaacc tcgctggtct gtctgacgat 780  
 ggtacggttt cctttacgct tggcagtggt ggcgacacag cgaccatctc cgcagcggta 840  
 acgaccactg acctgggtgc gctggccaaa gcgatcaacg atacctcagg caccactggt 900  
 gttacggctg aagcaaaccg tggcgaatc aactgaccc aggctgatgg caaagacatc 960  
 cgtctgcagg actttgcaa ctcaggtaac gcgaccgta ccgccacgct gcagggcagc 1020  
 ggtgacccat cagcggttac tttgaccgct ggcagcactg acagcacgat tgcttctggc 1080  
 tctgttgaat tcgcctcttc cgggtgcattc tcagtaagct cctctgtcgc agagactgcc 1140  
 ggtagcattc tgaacgtcgc agccgacacc gtggttggtt ccaacctcca gtcagtgtct 1200  
 tctatcgaca tcggtactgt tgcgggcgct aacagcgcaa tcgagattgc agatgcccgt 1260  
 ctggagcaga tcagtggtat ccgcgccgat ctgggtgctg cccagaaccg gttcagatct 1320  
 acgatcgcca acctgagcac aactgccgaa aacctgtcgg ccgctaacag ccggattctg 1380  
 gatgcagact tcgcatctga aactgctaag ctgtccaagg cgcaggttct ccagcaagct 1440  
 ggtatctctg tactggcaca ggcgaatgcc cgtccacagc aggttctgtc cctcctgcag 1500  
 taa 1503

5 <210> 22  
 <211> 500  
 <212> PRT  
 <213> Marinobacter algicola (DG893)

10 <220>  
 <221> Flagelina FR  
 <222> (1)..(500)

ES 2 569 417 T3

<400> 22

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



- <210> 23
  - <211> 1836
  - <212> DNA
  - <213> Marinobacter algicola (DG893)
- 5
- <220>
  - <221> Flagelina F4DUD
  - <222> (1)..(1836)
- 10
- <220>
  - <221> característica
  - <222> (1516)..(1590)
  - <223> Epítopo DUD
- 15
- <220>
  - <221> característica
  - <222> (1597)..(1671)
  - <223> Epítopo DUD
- 20
- <220>
  - <221> característica
  - <222> (1678)..(1752)
  - <223> Epítopo DUD
- 25
- <220>
  - <221> característica
  - <222> (1759)..(1833)
  - <223> Epítopo DUD
- 30
- <400> 23

ES 2 569 417 T3

atgcctcaga tcatcaacac caatattgcg tcgctgaatg cacagcgaaa cctgaatact 60  
 tcgcaggaag actccaacgt tgccctgcag cgactgtcat ccggcctgcg tatcaactcc 120  
 gccaaaggacg acgccgccgg actggccatc tccgagcgat tcacatcgca gatcaaaggt 180  
 ctcaaccagg ccattcgaaa cgccaatgac ggtatttccc tggctcagac cgccgaaggc 240  
 gccctggggc aatccggaaa catcctgcag cgcacccggg aactcgccgt acagtccgcc 300  
 aacgctacca actccgcac tgacaggaag gccctgcagt ctgaagtaaa ccagctaaaa 360  
 ggtgagctcg agcgcattgc caccaccacc gaattcaacg gactgaaact tctggacggc 420  
 accttccagg ctcagaagtt ccaggctggc gccaacgaaa accagagcat cgccgtttcc 480  
 atcgaaggtg cccgaaccgc cgacctagca aacaacacgc tcgacgctgc caacgcaacc 540  
 ctgaaccagg gcaccggttc aacaacggca gcgaatgcga cgttaccgcg aaaaaacacg 600  
 atcgccacgc agaatctcac catttccagc tcgctggaca gccaggtggt gccattaca 660  
 gcaggtgaca cagcggaga catcgccgca gccatcaacg acattggtgc cacgacgggt 720  
 gtgaacgcaa cggcaagaac atcggcgacc ctgagcaaca ccgctaccac gccaatcgcc 780  
 gtgcctcaaa ccgtatcgct cacgctttcc aacggtagca gttcagcaac catttccgcg 840  
 cagatcaccg atcgaacga cctctcagca attgcacgtg aggtgaacgc agcttccggc 900  
 aagaccggca ttaccgcca agtcgctaac gacggcagca tcacgctgat tcaggagcaa 960  
 ggtaaagaca tcaactattga agactttacc gcagcgggct ctacagcaact ggcggtacag 1020  
 ggtagtggcg atccaagtgc catcgaactg aaaaacgggt gtgccaatgc cacacgtatc 1080  
 gccggggaat tgacactgga ctctccggtt agcttcgcgg cgacgtctga cgccaccctg 1140  
 gccgcaggca gcgttctgaa cagtgcacag aataccgccg ccggctccac acctgaagaa 1200  
 gtggcaggta ttgatataag caccgttgac ggcgcaacca gtgcacttgc agttgtggat 1260  
 gcggcattgg aaaccatcag tggcattcgt gccgatctgg gcgcgcgca gaatcgactc 1320  
 gactcgacca ttgccaacct gactacgacc tctgagaacc tttcggccgc gcgttcgcga 1380  
 attcgtgatg cagactttgc cgccgaatcc gcggaactcg cccgcacca agtgcctccag 1440  
 caggctggct tctcggattt ggcccaggcc aacgcaagac cgcagcaggt tctgcagctg 1500  
 ctgcaggggt catgccatcc gactgagcct tacacgacag tcactactca gaactctgct 1560  
 tcacaaacaa tctcggctat tgaaaattta ggtaccatc cgactgagcc ttacacgaca 1620  
 gtcactactc agaactctgc ttcacaaaca atgtcggcta ttgaaaattt agctagccat 1680  
 ccgactgagc cttacacgac agtactact cagaacactg cttcacaac aatgtcggct 1740  
 attgaaaatt tactcgagca tccgactgag ccttacacga cagtactac tcagaacact 1800  
 gcttcacaaa caatgtcggc tattgaaaat ttataa 1836

<210> 24  
 <211> 610  
 <212> PRT  
 <213> Marinobacter algicola (DG893)

5

<220>  
 <221> Flagelina F4DUD  
 <222> (1)..(610)

10

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (506)..(530)  
 <223> Epítopo DUD

15

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (533)..(557)  
 <223> Epítopo DUD

20

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (560)..(584)  
 <223> Epítopo DUD

25

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (587)..(610)  
 <223> Epítopo DUD

30

<400> 24

**Met Pro Gln Ile Ile Asn Thr Asn Ile Ala Ser Leu Asn Ala Gln Arg**  
**1 5 10 15**

**Asn Leu Asn Thr Ser Gln Glu Asp Ser Asn Val Ala Leu Gln Arg Leu**  
**20 25 30**

35

ES 2 569 417 T3

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Leu  
35 40 45

Ala Ile Ser Glu Arg Phe Thr Ser Gln Ile Lys Gly Leu Asn Gln Ala  
50 55 60

Ile Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Leu Ala Gln Thr Ala Glu Gly  
65 70 75 80

Ala Leu Gly Glu Ser Gly Asn Ile Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Ala  
85 90 95

Val Gln Ser Asn Ala Thr Asn Ser Ala Ser Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
100 105 110

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

Thr Glu Phe Asn Gly Leu Lys Leu Leu Asp Gly Thr Phe Gln Ala Gln  
130 135 140

Lys Phe Gln Ala Gly Ala Asn Glu Asn Gln Ser Ile Ala Val Ser Ile  
145 150 155 160

Glu Gly Ala Arg Thr Ala Asp Leu Ala Asn Asn Thr Leu Asp Ala Ala  
165 170 175

Asn Ala Thr Leu Asn Gln Gly Thr Gly Ser Thr Thr Ala Ala Asn Ala  
180 185 190

Thr Leu Pro Ala Gln Asn Thr Ile Ala Thr Gln Asn Leu Thr Ile Ser  
195 200 205

Ser Ser Leu Asp Ser Gln Val Val Pro Ile Thr Ala Gly Asp Thr Ala  
210 215 220

Glu Asp Ile Ala Ala Ala Ile Asn Asp Ile Gly Ala Thr Thr Gly Val  
225 230 235 240

Asn Ala Thr Ala Arg Thr Ser Ala Thr Leu Ser Asn Thr Ala Thr Thr  
245 250 255

Pro Ile Ala Val Pro Gln Thr Val Ser Leu Thr Leu Ser Asn Gly Ser  
260 265 270

Ser Ser Ala Thr Ile Ser Ala Gln Ile Thr Asp Ala Asn Asp Leu Ser  
275 280 285

Ala Ile Ala Arg Glu Val Asn Ala Ala Ser Gly Lys Thr Gly Ile Thr  
290 295 300

Ala Glu Val Ala Asn Asp Gly Ser Ile Thr Leu Ile Gln Glu Gln Gly  
305 310 315 320

Lys Asp Ile Thr Ile Glu Asp Phe Thr Ala Ala Gly Ser Gln Gln Leu  
325 330 335

Ala Val Gln Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ala Ile Glu Leu Thr Asn Gly  
340 345 350

Gly Ala Asn Ala Thr Arg Ile Ala Gly Glu Leu Thr Leu Asp Ser Ser  
355 360 365

Val Ser Phe Ala Ala Thr Ser Asp Ala Thr Leu Ala Ala Gly Ser Val



370						375						380					
Leu	Asn	Ser	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Pro	Glu	Glu	Val		
385					390					395					400		
Ala	Gly	Ile	Asp	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala		
				405					410					415			
Val	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Thr	Ile	Ser	Gly	Ile	Arg	Ala	Asp	Leu		
			420					425					430				
Gly	Ala	Ala	Gln	Asn	Arg	Leu	Glu	Ser	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Ser	Thr		
		435					440					445					
Thr	Ser	Glu	Asn	Leu	Ser	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg	Ile	Arg	Asp	Ala	Asp		
	450					455					460						
Phe	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Thr	Gln	Val	Leu	Gln	Gln		
465					470					475					480		
Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Ala	Asn	Ala	Arg	Pro	Gln	Gln	Val		
				485					490					495			
Leu	Gln	Leu	Leu	Gln	Gly	Ala	Cys	His	Pro	Thr	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr		
			500					505					510				
Val	Thr	Thr	Gln	Asn	Thr	Ala	Ser	Gln	Thr	Met	Ser	Ala	Ile	Glu	Asn		
		515					520					525					
Leu	Gly	Thr	His	Pro	Thr	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Gln	Asn		
	530					535					540						
Thr	Ala	Ser	Gln	Thr	Met	Ser	Ala	Ile	Glu	Asn	Leu	Ala	Ser	His	Pro		
545					550					555					560		
Thr	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Gln	Asn	Thr	Ala	Ser	Gln	Thr		
				565					570					575			
Met	Ser	Ala	Ile	Glu	Asn	Leu	Leu	Glu	His	Pro	Thr	Glu	Pro	Tyr	Thr		
			580					585					590				
Thr	Val	Thr	Thr	Gln	Asn	Thr	Ala	Ser	Gln	Thr	Met	Ser	Ala	Ile	Glu		
		595					600					605					
Asn	Leu																
	610																

<210> 25  
 <211> 1827  
 <212> DNA  
 <213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>  
 <221> Flagelina FR4DUD  
 <222> (1)..(1827)

<220>  
<221> característica  
<222> (1507)..(1581)  
<223> Epítopo DUD  
5  
<220>  
<221> característica  
<222> (1588)..(1662)  
<223> Epítopo DUD  
10  
<220>  
<221> característica  
<222> (1669)..(1743)  
<223> Epítopo DUD  
15  
<220>  
<221> característica  
<222> (1750)..(1824)  
<223> Epítopo DUD  
20  
<400> 25

ES 2 569 417 T3

atggctctcg gtattaacac taacgttgcg tcaactgtcag ctcaagaacca gctgaacaaa 60  
tcccaggagc tttctaacca agctctggag cgtctgtctt ccggtctgcy catcaactcc 120  
gccaaaggacg atgctgctgg ccttgcaatt tcgaccogtt ttcagtcca gatctctggt 180  
ctgaatggtg cccagcgtaa cgccaacgac ggtatttccc tggctcagac tgctgaaggc 240  
gctctggaag aaaccaccaa catcctgcag cgcacccgtg agctgtctgt tcagtcggcc 300  
aactctacca actcttcttc cgaccgctct gcacttcagg gcgaagtaa ccagctgaag 360  
caagagcttg atcgtattgc cggcaccacc cagtttaacg gcctcaacct tctggatggc 420  
agcttcactg cccagtcatt ccaggctggc gccaacgcta accagaccat ctccgtctct 480  
gtaactggcg ctctgtggcg cgacctggc aacaacaccg tatccggcga aagtgaacc 540  
actgtcagtc agggcacggg ttctgttgca gtcgcccggc ctgatgtggc aaccgttgc 600  
aacaatacga ttgctacaca gaacatcacc gtttctggaa ctgaaggctc tgaggctatc 660  
ggtattacc agggcgatac tgcagaagcg attgcccgtg ctgttaacgc tgaaccggc 720  
acgactggcg taacggctac ggcaccacc accgcaacc tcgctggctc gtctgacgat 780  
ggtacggctt cctttacgct tggcagtggt ggcgacacag cgaccatctc cgcagcggta 840  
acgaccactg acctgggtgc gctggccaaa gcgatcaacg atacctcagg caccactggt 900  
gttacggctg aagcaaaccg tggcgaaatc aactgacc accgctgatgg caaagacatc 960  
cgtctgcagg actttgcca ctcaggtaac gcgaccggta ccgccacgct gcagggcagc 1020  
ggtgaccat cagcggctac tttgaccgct ggcagcactg acagcacgat tgcttctggc 1080  
tctgttgaat tcgcctcttc cggcgcattc tcagtaagct cctctgtcgc agagactgcc 1140  
ggtagcattc tgaacgtcgc agccgacacc gtggctggct ccaacctcca gtcagctctc 1200  
tctatcgaca tcggtactgt tgcgggcgct aacagcga tcgagattgc agatgcggct 1260  
ctggagcaga tcagtggtat ccgcgccgat ctgggtgctg ccagaaaccg gttcagctct 1320  
acgatcgcca acctgagcac aactgccgaa aacctgtcgg ccgctaacag ccggattctg 1380  
gatgcagact tcgcatctga aactgctaag ctgtccaagg cgcaggttct ccagcaagct 1440  
ggtatctctg tactggcaca ggcgaatgcc cgtccacagc aggttctgtc cctcctgcag 1500  
caattccatc cgactgagcc ttacacgaca gtcactactc agaactctgc ttcacaaaca 1560  
atgtcggcta ttgaaaattt aggtaccat ccgactgagc cttacacgac agtcactact 1620  
cagaactctg cttcacaac aatgtcggct attgaaaatt tagctagcca tccgactgag 1680  
ccttacaga cagtcactac tcagaact gcttcacaaa caatgtcggc tattgaaaat 1740  
ttactcgagc atccgactga gccttacag acagtcacta ctcaaacac tgcttcacaa 1800  
acaatgtcgg ctattgaaaa tttataa 1827

ES 2 569 417 T3

<210> 26  
 <211> 608  
 <212> PRT  
 <213> Marinobacter algicola (DG893)

5 <220>  
 <221> Flagelina FR4DUD  
 <222> (1)..(608)

10 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (503)..(527)  
 <223> Epítopo DUD

15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (530)..(554)  
 <223> Epítopo DUD

20 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (557)..(581)  
 <223> Epítopo DUD

25 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (584)..(608)  
 <223> Epítopo DUD

30 <400> 26

```

Met Ala Leu Gly Ile Asn Thr Asn Val Ala Ser Leu Ser Ala Gln Asn
1 5 10 15

Gln Leu Asn Lys Ser Gln Glu Leu Ser Asn Gln Ala Leu Glu Arg Leu
20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Leu
35 40 45

Ala Ile Ser Thr Arg Phe Gln Ser Gln Ile Ser Gly Leu Asn Val Ala
50 55 60

Gln Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Leu Ala Gln Thr Ala Glu Gly
65 70 75 80

Ala Leu Glu Glu Thr Thr Asn Ile Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Ser
85 90 95

Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu
100 105 110

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

Thr Thr Gln Phe Asn Gly Leu Asn Leu Leu Asp Gly Ser Phe Thr Ala
  
```

35





<222> (1585)..(1655)  
<223> Epítopo M2-2009

5 <220>  
<221> característica  
<222> (1656)..(1728)  
<223> Epítopo M2-2009

10 <220>  
<221> característica  
<222> (1729)..(1800)  
<223> Epítopo M2-2009

15 <220>  
<221> característica  
<222> (1807)..(1825)  
<223> Secuencia que codifica para una cola de histidinas

20 <220>  
<221> característica  
<222> (1835)..(1846)  
<223> Secuencia que codifica para la secuencia KDEL

<400> 28

ES 2 569 417 T3

ggatccatgg	ctctcggtat	taacactaac	gttgcgtcac	tgtcagctca	gaaccagctg	60
aacaaatccc	aggagctttc	taaccaagct	ctggagcgtc	tgtcttccgg	tctgcgcatac	120
aactccgcc	aggacgatgc	tgctggcctt	gcaatttcga	cccgttttca	gtcccagatc	180
tctggctctga	atggtgcccc	gcgtaacgcc	aacgacggta	ttccctggc	tcagactgct	240
gaaggtgctc	tggaagaaac	caccaacatc	ctgcagcgc	tcgctgagct	gtctgttcag	300
tcggccaact	ctaccaactc	ttcttccgac	cgctctgcac	ttcagggcga	agtaaaccag	360
ctgaagcaag	agcttgatcg	tattgccggt	accaccagct	ttaacggcct	caaccttctg	420
gatggcagct	tactgcccc	gtcattccag	gttggtgcca	acgctaacca	gaccatctcg	480
gtctctgtaa	ctggcgctcg	tggtgccgac	cttggtaaca	acaccgtatc	cggtgaaagt	540
gataccactg	tcagtcaggg	cacgggttct	gttgcagctg	cggccgctga	tgtggcaacc	600
gttgccaaca	atacgattgc	tacacagaac	atcaccgttt	ctggaactga	aggctctgag	660
gtcatcggt	ttaccaggg	cgatactgca	gaagcgattg	cggctgctgt	taacgctgaa	720
accggcacga	ctggtgtaac	ggctacggca	tccaccacgg	caaccctcgc	tggtctgtct	780
gacgatggta	cggtttctct	tacgcttggc	agtgggtggc	acacagcgc	catctccgca	840
gcggtaacga	ccactgacct	gggtgcgctg	gccaaagcga	tcaacgatac	ctcaggcacc	900
actggtggt	cggctgaagc	aaacgggtgc	gaaatcacac	tgaccagggc	tgatggcaaa	960
gacatccgct	tgcaggactt	tgccaactca	ggtaacgcga	ccggtaccgc	cacgctgcag	1020
ggcagcgggt	accatcagc	ggttactttg	accgctggca	gactgacag	cacgattgct	1080
tctggctctg	ttgaattcgc	ctcttccggt	gcattctcag	taagctctc	tgtcgcagag	1140
actgccggt	gcattctgaa	cgctgcagcc	gacaccgtgg	ttggttccaa	cctccagtca	1200
gtgtcttcta	tcgacatcgg	tactggtgcg	ggcgctaaca	gcgcaatcga	gattgcagat	1260
gcggtctctg	agcagatcag	tggtatccgc	gccgatctgg	gtgctgcccc	gaaccgggtc	1320
gagtctacga	tcgccaacct	gagcacaact	gccgaaaacc	tgtcggccgc	taacagccgg	1380



ES 2 569 417 T3

**attctggatg cagacttcgc atctgaaact gctaagotgt ccaaggcgca ggttctccag 1440**  
**caagctggta tctctgtact ggcacaggcg aatgcccgtc cacagcaggt tctgtccctc 1500**  
**ctgcagcaat tcatgagtct tctaaccgag gtcgaaacgc ctaccagaag cgaatgggag 1560**  
**tgcagatgca gcgattcaag tgatatgagt cttctaaccg aggtcgaaac gcctaccaga 1620**  
**agcgaatggg agtgcagatg cagcgattca agtgatatga gtcttctaac cgaggtcgaa 1680**  
**acgcctacca gaagcgaatg ggagtgcaga tgcagcgatt caagtgatat gagtcttcta 1740**  
**accgaggtcg aaacgcctac cagaagcgaa tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtgat 1800**  
**tctagacatc accaccacca tcaccatgct agaaaagatg aactgtaaaa gctt 1854**

5 <210> 29  
 <211> 617  
 <212> PRT  
 <213> Marinobacter algicola (DG893)  
  
 10 <220>  
 <221> Flagelina FR4M2-2009  
 <222> (1)..(617)  
  
 15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (505)..(528)  
 <223> Epítopo M2-2009  
  
 20 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (529)..(552)  
 <223> Epítopo M2-2009  
  
 25 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (553)..(576)  
 <223> Epítopo M2-2009  
  
 30 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (577)..(600)  
 <223> Epítopo M2-2009  
  
 35 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA  
 <222> (612)..(615)  
 <223> Secuencia KDEL  
  
 <400> 29

ES 2 569 417 T3

Gly	Ser	Met	Ala	Leu	Gly	Ile	Asn	Thr	Asn	Val	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala
1				5					10					15	
Gln	Asn	Gln	Leu	Asn	Lys	Ser	Gln	Glu	Leu	Ser	Asn	Gln	Ala	Leu	Glu
			20					25					30		
Arg	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Arg	Ile	Asn	Ser	Ala	Lys	Asp	Asp	Ala	Ala
		35					40					45			
Gly	Leu	Ala	Ile	Ser	Thr	Arg	Phe	Gln	Ser	Gln	Ile	Ser	Gly	Leu	Asn
	50					55					60				

ES 2 569 417 T3

Val Ala Gln Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Leu Ala Gln Thr Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Ala Leu Glu Glu Thr Thr Asn Ile Leu Gln Arg Ile Arg Glu  
 85 90 95  
 Leu Ser Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Ser Ser Asp Arg Ser  
 100 105 110  
 Ala Leu Gln Gly Glu Val Asn Gln Leu Lys Gln Glu Leu Asp Arg Ile  
 115 120 125  
 Ala Gly Thr Thr Gln Phe Asn Gly Leu Asn Leu Leu Asp Gly Ser Phe  
 130 135 140  
 Thr Ala Gln Ser Phe Gln Val Gly Ala Asn Ala Asn Gln Thr Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Val Ser Val Thr Gly Ala Arg Gly Ala Asp Leu Gly Asn Asn Thr Val  
 165 170 175  
 Ser Gly Glu Ser Asp Thr Thr Val Ser Gln Gly Thr Gly Ser Val Ala  
 180 185 190  
 Val Ala Ala Ala Asp Val Ala Thr Val Ala Asn Asn Thr Ile Ala Thr  
 195 200 205  
 Gln Asn Ile Thr Val Ser Gly Thr Glu Gly Ser Glu Val Ile Gly Ile  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Asp Thr Ala Glu Ala Ile Ala Ala Ala Val Asn Ala Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Gly Thr Thr Gly Val Thr Ala Thr Ala Ser Thr Thr Ala Thr Leu  
 245 250 255  
 Ala Gly Leu Ser Asp Asp Gly Thr Val Ser Phe Thr Leu Gly Ser Gly  
 260 265 270  
 Gly Asp Thr Ala Thr Ile Ser Ala Ala Val Thr Thr Thr Asp Leu Gly  
 275 280 285  
 Ala Leu Ala Lys Ala Ile Asn Asp Thr Ser Gly Thr Thr Gly Val Thr  
 290 295 300  
 Ala Glu Ala Asn Gly Gly Glu Ile Thr Leu Thr Gln Ala Asp Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Asp Ile Arg Leu Gln Asp Phe Ala Asn Ser Gly Asn Ala Thr Gly Thr  
 325 330 335  
 Ala Thr Leu Gln Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ala Val Thr Leu Thr Ala  
 340 345 350  
 Gly Ser Thr Asp Ser Thr Ile Ala Ser Gly Ser Val Glu Phe Ala Ser  
 355 360 365  
 Ser Gly Ala Phe Ser Val Ser Ser Ser Val Ala Glu Thr Ala Gly Ser  
 370 375 380  
 Ile Leu Asn Val Ala Ala Asp Thr Val Val Gly Ser Asn Leu Gln Ser  
 385 390 395 400  
 Val Ser Ser Ile Asp Ile Gly Thr Val Ala Gly Ala Asn Ser Ala Ile  
 405 410 415

Glu Ile Ala Asp Ala Ala Leu Glu Gln Ile Ser Gly Ile Arg Ala Asp  
 420 425 430  
 Leu Gly Ala Ala Gln Asn Arg Phe Glu Ser Thr Ile Ala Asn Leu Ser  
 435 440 445  
 Thr Thr Ala Glu Asn Leu Ser Ala Ala Asn Ser Arg Ile Leu Asp Ala  
 450 455 460  
 Asp Phe Ala Ser Glu Thr Ala Lys Leu Ser Lys Ala Gln Val Leu Gln  
 465 470 475 480  
 Gln Ala Gly Ile Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Ala Arg Pro Gln Gln  
 485 490 495  
 Val Leu Ser Leu Leu Gln Gln Phe Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu  
 500 505 510  
 Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp  
 515 520 525  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu  
 530 535 540  
 Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu  
 545 550 555 560  
 Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp  
 565 570 575  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu  
 580 585 590  
 Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Ser Arg His His His His His His  
 595 600 605  
 His Ala Arg Lys Asp Glu Leu Lys Leu  
 610 615

<210> 30  
 <211> 1815  
 <212> DNA  
 5 <213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>  
 <221> Flagelina FR4M2-2009  
 <222> (1)..(1815)

10 <220>  
 <221> característica  
 <222> (1538)..(1584)  
 <223> Epítopo M2-2009

15 <220>  
 <221> característica  
 <222> (1585)..(1655)  
 <223> Epítopo M2-2009

<220>  
<221> característica  
<222> (1656)..(1728)  
<223> Epítopo M2-2009

5

<220>  
<221> característica  
<222> (1729)..(1800)  
<223> Epítopo M2-2009

10

<400> 30

ES 2 569 417 T3

ggatccatgg ctctcgggat taactactaac gttgcggtcac tgtcagctca gaaccagctg 60  
 aacaaatccc aggagctttc taaccaagct ctggagcgtc tgtcttccgg tctgcgcac 120  
 aactccgcca aggacgatgc tgctggcctt gcaatttcga cccgttttca gtcccagatc 180  
 tctggctctga atggtgcccc gcgtaacgcc aacgacggta ttccctggc tcagactgct 240  
 gaaggtgctc tggaagaaac caccaacatc ctgcagcgc tccgtgagct gtctgttcag 300  
 tcggccaact ctaccaactc ttcttccgac cgctctgcac ttcagggcga agtaaaccag 360  
 ctgaagcaag agcttgatcg tattgccggt accaccaggt ttaacggcct caaccttctg 420  
 gatggcagct tcaactgccc gtcattccag gttgggtgcca acgctaacca gaccatctcg 480  
 gtctctgtaa ctggcgcctc tggtgccgac cttggtaaca acaccgtatc cggtgaaagt 540  
 gataccactg tcagtcaggg cacgggttct gttgcagtcg cggccgctga tgtggcaacc 600  
 gttgccaaca atacgattgc tacacagaac atcaccgttt ctggaactga aggctctgag 660  
 gtcacggta ttaccaggg cgatactgca gaagcgattg cggctgctgt taacgctgaa 720  
 accggcacga ctggtgtaac ggctacggca tccaccacgg caaccctcgc tggctctgtct 780  
 gacgatggta cggtttcctt tacgcttggc agtggtggcg acacagcgc catctccgca 840  
 gcggtaacga ccaactgacct ggggtgcgctg gccaaagcga tcaacgatac ctcaggcacc 900  
 actggtgta cggctgaagc aaacgggtggc gaaatcacac tgaccagggc tgatggcaaa 960  
 gacatccgtc tgcaggactt tgccaactca ggtaacgcga cgggtaccgc cacgctgcag 1020  
 ggcagcgggtg acccatcagc gggtactttg accgctggca gcaactgacag cacgattgct 1080  
 tctggctctg ttgaattcgc ctcttccggt gcattctcag taagctcctc tgtcgcagag 1140  
 actgccggta gcattctgaa cgtcgcagcc gacaccgtgg ttggttccaa cctccagtca 1200  
 gtgtcttcta tcgacatcgg tactgttgcg ggcgctaaca gcgcaatcga gattgcagat 1260  
 gcggtctctg agcagatcag tggatccgc gccgatctgg gtgctgcccga gaaccggttc 1320  
 gagtctacga tcgccaacct gagcacaact gccgaaaacc tgtcggccgc taacagccgg 1380  
 attctggatg cagacttcgc atctgaaact gctaagctgt ccaaggcgc ggttctccag 1440  
 caagctggta totctgtact ggcacagggc aatgcccgtc cacagcaggt tctgtccctc 1500  
 ctgcagcaat tcatgagtct tctaaccgag gtcgaaacgc ctaccagaag cgaatgggag 1560  
 tgcagatgca gcgattcaag tgatatgagt cttctaaccg aggtcgaaac gcctaccaga 1620  
 agcgaatggg agtgcagatg cagcgattca agtgatatga gtcttctaac cgaggtcgaa 1680  
 acgcctacca gaagcgaatg ggagtgcaga tgcagcgatt caagtgatat gagtcttcta 1740  
 accgaggtcg aaacgcctac cagaagcga tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtgat 1800

- 5 <210> 31  
<211> 604  
<212> PRT  
<213> Marinobacter algicola (DG893)
- 10 <220>  
<221> Flagelina FR4M2-2009  
<222> (1)..(604)
- 15 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (505)..(528)  
<223> Epítopo M2-2009
- 20 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (529)..(552)  
<223> Epítopo M2-2009
- 25 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (553)..(576)  
<223> Epítopo M2-2009
- 30 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA  
<222> (577)..(600)  
<223> Epítopo M2-2009
- <400> 31

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



Val Ser Val Thr Gly Ala Arg Gly Ala Asp Leu Gly Asn Asn Thr Val  
 165 170 175  
 Ser Gly Glu Ser Asp Thr Thr Val Ser Gln Gly Thr Gly Ser Val Ala  
 180 185 190  
 Val Ala Ala Ala Asp Val Ala Thr Val Ala Asn Asn Thr Ile Ala Thr  
 195 200 205  
 Gln Asn Ile Thr Val Ser Gly Thr Glu Gly Ser Glu Val Ile Gly Ile  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Asp Thr Ala Glu Ala Ile Ala Ala Ala Val Asn Ala Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Gly Thr Thr Gly Val Thr Ala Thr Ala Ser Thr Thr Ala Thr Leu  
 245 250 255  
 Ala Gly Leu Ser Asp Asp Gly Thr Val Ser Phe Thr Leu Gly Ser Gly  
 260 265 270  
 Gly Asp Thr Ala Thr Ile Ser Ala Ala Val Thr Thr Thr Asp Leu Gly  
 275 280 285  
 Ala Leu Ala Lys Ala Ile Asn Asp Thr Ser Gly Thr Thr Gly Val Thr  
 290 295 300  
 Ala Glu Ala Asn Gly Gly Glu Ile Thr Leu Thr Gln Ala Asp Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Asp Ile Arg Leu Gln Asp Phe Ala Asn Ser Gly Asn Ala Thr Gly Thr  
 325 330 335  
 Ala Thr Leu Gln Gly Ser Gly Asp Pro Ser Ala Val Thr Leu Thr Ala  
 340 345 350  
 Gly Ser Thr Asp Ser Thr Ile Ala Ser Gly Ser Val Glu Phe Ala Ser  
 355 360 365  
 Ser Gly Ala Phe Ser Val Ser Ser Ser Val Ala Glu Thr Ala Gly Ser  
 370 375 380  
 Ile Leu Asn Val Ala Ala Asp Thr Val Val Gly Ser Asn Leu Gln Ser  
 385 390 395 400  
 Val Ser Ser Ile Asp Ile Gly Thr Val Ala Gly Ala Asn Ser Ala Ile  
 405 410 415  
 Glu Ile Ala Asp Ala Ala Leu Glu Gln Ile Ser Gly Ile Arg Ala Asp  
 420 425 430  
 Leu Gly Ala Ala Gln Asn Arg Phe Glu Ser Thr Ile Ala Asn Leu Ser  
 435 440 445  
 Thr Thr Ala Glu Asn Leu Ser Ala Ala Asn Ser Arg Ile Leu Asp Ala  
 450 455 460  
 Asp Phe Ala Ser Glu Thr Ala Lys Leu Ser Lys Ala Gln Val Leu Gln  
 465 470 475 480  
 Gln Ala Gly Ile Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Ala Arg Pro Gln Gln  
 485 490 495

Val Leu Ser Leu Leu Gln Gln Phe Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu  
 500 505 510  
 Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp  
 515 520 525  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu  
 530 535 540  
 Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu  
 545 550 555 560  
 Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp  
 565 570 575  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu  
 580 585 590  
 Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Ser Arg Lys Leu  
 595 600

- 5 <210> 32
- <211> 1956
- <212> DNA
- <213> Marinobacter algicola (DG893)
  
- 10 <220>
- <221> Plásmido pRSETA-FR4M2-2009
- <222> (1)..(1956)
  
- 15 <220>
- <221> característica
- <222> (110)..(1607)
- <223> Secuencia de la Flagelina FR
  
- 20 <220>
- <221> característica
- <222> (1613)..(1684)
- <223> Epítipo M2-2009
  
- 25 <220>
- <221> característica
- <222> (1685)..(1756)
- <223> Epítipo M2-2009
  
- 30 <220>
- <221> característica
- <222> (1757)..(1828)
- <223> Epítipo M2-2009
  
- 35 <220>
- <221> característica
- <222> (1829)..(1901)
- <223> Epítipo M2-2009
  
- 40 <220>
- <221> característica
- <222> (1908)..(1928)
- <223> Secuencia que codifica para una cola de histidinas

<220>

<221> característica

<222> (1935)..(1946)

<223> Secuencia que codifica para la secuencia KDEL

5

<400> 32

ES 2 569 417 T3

atgcgggggtt	ctcatcatca	tcatcatcat	ggtatggcta	gcatgactgg	tggacagcaa	60
atgggtcggg	atctgtacga	cgatgacgat	aaggatcgat	ggggatccat	ggctctcggt	120
attaacacta	acgttgogtc	actgtcagct	cagaaccagc	tgaacaaatc	ccaggagctt	180
tctaaccaag	ctctggagcg	tctgtcttcc	ggtctgcgca	tcaactccgc	caaggacgat	240
gctgctggcc	ttgcaatttc	gacccgtttt	cagtcccaga	tctctggtct	gaatgttgcc	300
cagcgtaacg	ccaacgacgg	tatttccttg	gctcagactg	ctgaagggtc	tctggaagaa	360
accaccaaca	tcctgcagcg	catccgtgag	ctgtctgttc	agtcggccaa	ctctaccaac	420
tcttcttccg	accgctctgc	acttcagggc	gaagtaaacc	agctgaagca	agagcttgat	480
cgtattgccg	gtaccacca	gtttaacggc	ctcaaccttc	tggatggcag	cttcactgcc	540
cagtcattcc	aggttggtgc	caacgctaac	cagaccatct	cggctctctgt	aactggcgct	600
cgtggtgccg	accttggtaa	caacaccgta	tccggtgaaa	gtgataccac	tgtcagtcag	660
ggcacggggtt	ctggtgcagt	cgcgcccgct	gatgtggcaa	ccggttgccaa	caatacgatt	720
gctacacaga	acatcaccgt	ttctggaact	gaaggctctg	aggtcatcgg	tattaccag	780
ggcgatactg	cagaagcgat	tgcggctgct	gttaacgctg	aaaccggcac	gactggtgta	840
acggctacgg	catccaccac	ggcaaccctc	gctggtctgt	ctgacgatgg	tacggtttcc	900
tttacgcttg	gcagtggtgg	cgacacagcg	accatctccg	cagcggtaac	gaccactgac	960
ctgggtgcgc	tggccaaagc	gatcaacgat	acctcaggca	ccactggtgt	tacggctgaa	1020
gcaaacgggtg	gcgaaatcac	actgaccag	gctgatggca	aagacatccg	tctgcaggac	1080
tttgccaact	caggtaacgc	gaccggtagc	gccacgctgc	agggcagcgg	tgaccatca	1140
gcggttactt	tgaccgctgg	cagcactgac	agcacgattg	cttctggctc	tgttgaattc	1200
gcctcttccg	gtgcattctc	agtaagctcc	tctgtcgcag	agactgccgg	tagcattctg	1260
aacgtcgcag	ccgacaccgt	ggttggttcc	aacctccagt	cagtgtcttc	tatcgacatc	1320
ggtactgttg	cgggcgctaa	cagcgcaatc	gagattgcag	atgcccgtct	ggagcagatc	1380
agtggtatcc	gcgccgatct	gggtgctgcc	cagaaccggt	tcgagtctac	gatcgccaac	1440
ctgagcacia	ctgccgaaaa	cctgtcggcc	gctaacagcc	ggattctgga	tgcagacttc	1500
gcatctgaaa	ctgctaagct	gtccaaggcg	caggttctcc	agcaagctgg	tatctctgta	1560
ctggcacagg	cgaatgcccg	tccacagcag	gttctgtccc	tcctgcagca	attcatgagt	1620
cttctaaccg	aggtcgaaac	gcctaccaga	agcgaatggg	agtgcagatg	cagcgattca	1680
agtgatatga	gtcttctaac	cgaggtcgaa	acgcctacca	gaagcgaatg	ggagtgcaga	1740
tgcagcgatt	caagtgatat	gagtcttcta	accgaggtcg	aaacgcctac	cagaagcgaa	1800
tgggagtgca	gatgcagcga	ttcaagtgat	atgagtcttc	taaccgaggt	cgaaacgcct	1860

**accagaagcg aatgggagtg cagatgcagc gattcaagtg attctagaca tcaccaccac 1920**

**catcaccatg ctagaaaaga tgaactgtaa aagctt 1956**

5

<210> 33

<211> 650

<212> PRT

10 <213> Marinobacter algicola (DG893)

<220>

<221> Plásmido pRSETA-FR4M2-2009

15 <222> (1)..(650)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA

<222> (37)..(536)

20 <223> Flagelina FR

<220>

<221> CARACTERÍSTICA

<222> (539)..(562)

25 <223> Epítopo M2-2009

<220>

<221> CARACTERÍSTICA

<222> (563)..(586)

30 <223> Epítopo M2-2009

<220>

<221> CARACTERÍSTICA

<222> (587)..(610)

35 <223> Epítopo M2-2009

<220>

<221> CARACTERÍSTICA

<222> (611)..(634)

40 <223> Epítopo M2-2009

<220>

<221> CARACTERÍSTICA

<222> (637)..(643)

45 <223> Cola de histidinas

<220>

<221> CARACTERÍSTICA

<222> (645)..(648)

50 <223> Secuencia KDEL

<400> 33

ES 2 569 417 T3

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

ES 2 569 417 T3

65					70						75					80
Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Ile	Ser	Thr	Arg	Phe	Gln	Ser	Gln	Ile	Ser	Gly	
				85					90					95		
Leu	Asn	Val	Ala	Gln	Arg	Asn	Ala	Asn	Asp	Gly	Ile	Ser	Leu	Ala	Gln	
			100					105					110			
Thr	Ala	Glu	Gly	Ala	Leu	Glu	Glu	Thr	Thr	Asn	Ile	Leu	Gln	Arg	Ile	
		115					120					125				
Arg	Glu	Leu	Ser	Val	Gln	Ser	Ala	Asn	Ser	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Asp	
	130					135					140					
Arg	Ser	Ala	Leu	Gln	Gly	Glu	Val	Asn	Gln	Leu	Lys	Gln	Glu	Leu	Asp	
145					150					155					160	
Arg	Ile	Ala	Gly	Thr	Thr	Gln	Phe	Asn	Gly	Leu	Asn	Leu	Leu	Asp	Gly	
				165					170					175		
Ser	Phe	Thr	Ala	Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Asn	Gln	Thr	
			180					185					190			
Ile	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Gly	Ala	Arg	Gly	Ala	Asp	Leu	Gly	Asn	Asn	
		195					200					205				
Thr	Val	Ser	Gly	Glu	Ser	Asp	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Gly	Thr	Gly	Ser	
	210					215					220					
Val	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Asp	Val	Ala	Thr	Val	Ala	Asn	Asn	Thr	Ile	
225					230					235					240	
Ala	Thr	Gln	Asn	Ile	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Val	Ile	
				245					250					255		
Gly	Ile	Thr	Gln	Gly	Asp	Thr	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	
			260					265					270			
Ala	Glu	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly	Val	Thr	Ala	Thr	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	
		275					280					285				
Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Thr	Val	Ser	Phe	Thr	Leu	Gly	
	290					295					300					
Ser	Gly	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Thr	Thr	Asp	
305					310					315					320	
Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Ile	Asn	Asp	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly	
				325					330					335		
Val	Thr	Ala	Glu	Ala	Asn	Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Leu	Thr	Gln	Ala	Asp	
			340					345					350			
Gly	Lys	Asp	Ile	Arg	Leu	Gln	Asp	Phe	Ala	Asn	Ser	Gly	Asn	Ala	Thr	
		355					360					365				
Gly	Thr	Ala	Thr	Leu	Gln	Gly	Ser	Gly	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Thr	Leu	
	370					375					380					
Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Asp	Ser	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	Glu	Phe	
385					390					395					400	
Ala	Ser	Ser	Gly	Ala	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	Thr	Ala	
				405					410					415		

Gly Ser Ile Leu Asn Val Ala Ala Asp Thr Val Val Gly Ser Asn Leu  
 420 425 430  
 Gln Ser Val Ser Ser Ile Asp Ile Gly Thr Val Ala Gly Ala Asn Ser  
 435 440 445  
 Ala Ile Glu Ile Ala Asp Ala Ala Leu Glu Gln Ile Ser Gly Ile Arg  
 450 455 460  
 Ala Asp Leu Gly Ala Ala Gln Asn Arg Phe Glu Ser Thr Ile Ala Asn  
 465 470 475 480  
 Leu Ser Thr Thr Ala Glu Asn Leu Ser Ala Ala Asn Ser Arg Ile Leu  
 485 490 495  
 Asp Ala Asp Phe Ser Glu Thr Ala Lys Leu Ser Lys Ala Gln Val Leu  
 500 505 510  
 Gln Gln Ala Gly Ile Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Ala Arg Pro Gln  
 515 520 525  
 Gln Val Leu Ser Leu Leu Gln Gln Phe Met Ser Leu Leu Thr Glu Val  
 530 535 540  
 Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser  
 545 550 555 560  
 Asp Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp  
 565 570 575  
 Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Met Ser Leu Leu Thr Glu Val  
 580 585 590  
 Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser  
 595 600 605  
 Asp Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp  
 610 615 620  
 Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Ser Arg His His His His His  
 625 630 635 640  
 His His Ala Arg Lys Asp Glu Leu Lys Leu  
 645 650



## REIVINDICACIONES

1. Adyuvante vacunal que comprende al menos una flagelina del género *Marinobacter*, preferentemente de la especie *Marinobacter algicola*.
- 5 2. Adyuvante vacunal la reivindicación 1, en que la al menos una flagelina se fusiona a al menos a un epítipo capaz de generar respuesta inmunológica, preferentemente en forma de 4 copias en tándem del mismo.
3. Adyuvante vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO:31, o  
10 una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:30.
4. Vacuna que comprende al menos un adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Vacuna que comprende al menos un adyuvante vacunal según la reivindicación 1 y al menos un epítipo capaz de generar respuesta inmune, no fusionado a dicho adyuvante.
- 15 6. Método de síntesis de adyuvantes vacunales caracterizados por comprender al menos una flagelina bacteriana del género *Marinobacter* caracterizado por:
  - a) Seleccionar al menos una de las secuencias génicas que codifican para flagelinas del género *Marinobacter*
  - b) Clonar al menos una de las secuencias génicas del paso anterior en un vector de expresión, en el que el vector de expresión se selecciona preferiblemente entre aquellos comprendidos en las siguientes cepas: CECT 20 7633, CECT 7634, CECT 7635 y CECT 7636,
  - c) Generar bacterias o virus, preferiblemente baculovirus, modificados mediante la inserción de vector del paso anterior.
  - d) Crecer las bacterias o virus modificados del paso anterior en condiciones adecuadas para favorecer la expresión de al menos una de las secuencias que codifican para flagelinas del género *Marinobacter* incluidas  
25 en el vector, y
  - e) Aislar al menos una de las flagelinas del género *Marinobacter* expresadas por las bacterias o virus que portan el vector de expresión del paso anterior.
7. Método según la reivindicación 6 caracterizado por que las secuencias génicas que codifican para las flagelinas del género *Marinobacter* se seleccionan preferentemente entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:30.  
30
8. Método según la reivindicación 6 caracterizado por que las secuencias génicas que codifican para las flagelinas del género *Marinobacter* comprenden adicionalmente una secuencia génica que codifica para al menos un epítipo capaz de generar respuesta inmunológica específica, preferentemente en forma de 4 copias en tándem del mismo.
9. Método según las reivindicaciones 6 a 8 caracterizado por que las secuencias génicas de las flagelinas del género *Marinobacter* comprenden adicionalmente una secuencia génica que codifica para un péptido capaz de facilitar el aislamiento o purificación de la flagelina, preferentemente una secuencia que codifica para una cola de histidinas.  
35
10. Método según la reivindicación 9 caracterizado por que las secuencias génicas de las flagelinas del género *Marinobacter* comprenden adicionalmente una secuencia génica que codifica para un péptido capaz de evitar la degradación de la flagelina, preferentemente una secuencia génica que codifica para el péptido KDEL.
- 40 11. Método de acuerdo con las reivindicaciones 6-10 caracterizado por que los virus modificados son utilizados preferentemente para transfectar células de mamífero o, más preferentemente, células de insecto.
12. Uso de cualquiera de las secuencias seleccionadas entre: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23. SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID  
45 NO:30 y SEQ ID NO:31, para la fabricación de adyuvantes vacunales y/o vacunas.
13. Vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 para su uso en un método de vacunación.
14. Vacuna para uso en vacunación de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la vacuna de las reivindicaciones 4 o 5 es administrada antes o después de la administración de al menos una dosis efectiva de una vacuna que comprende, al menos, una flagelina de *Salmonella*.

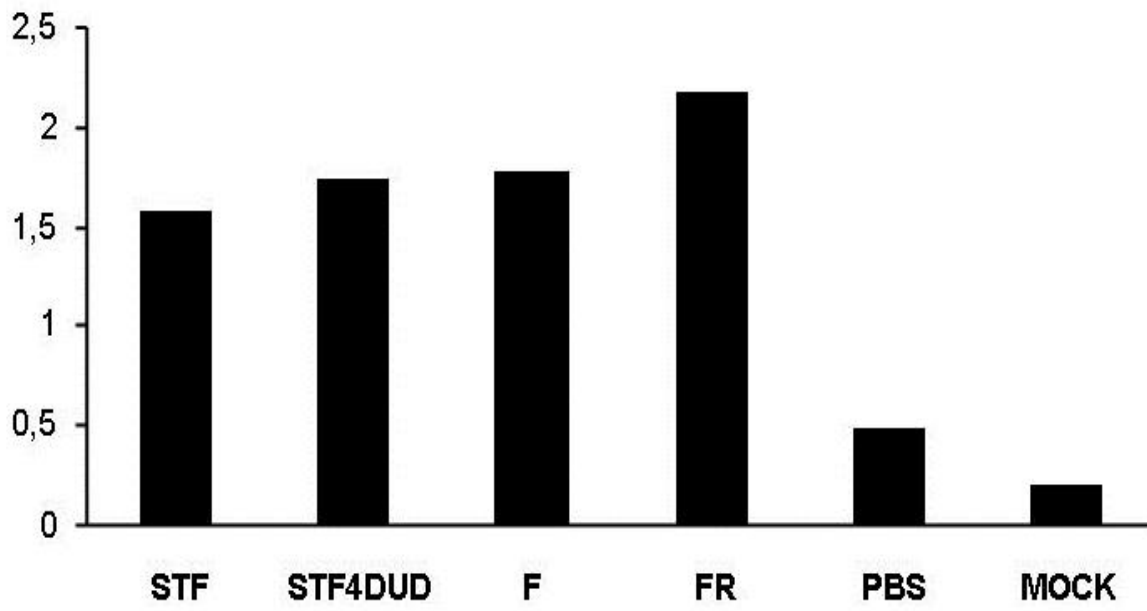


Figura 1

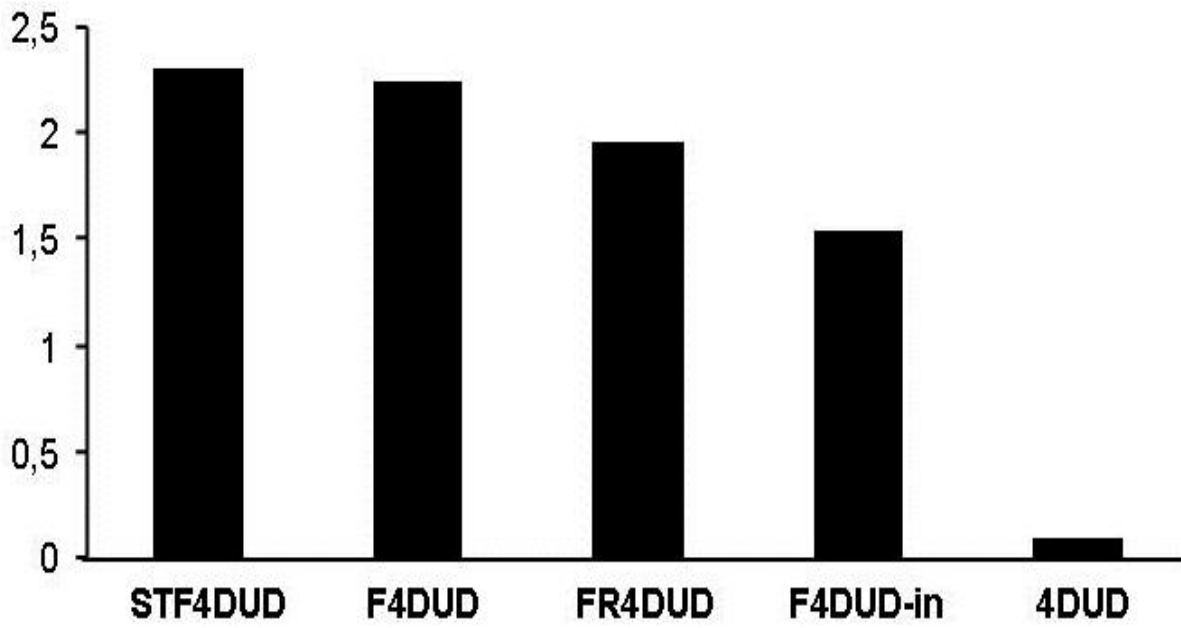


Figura 2

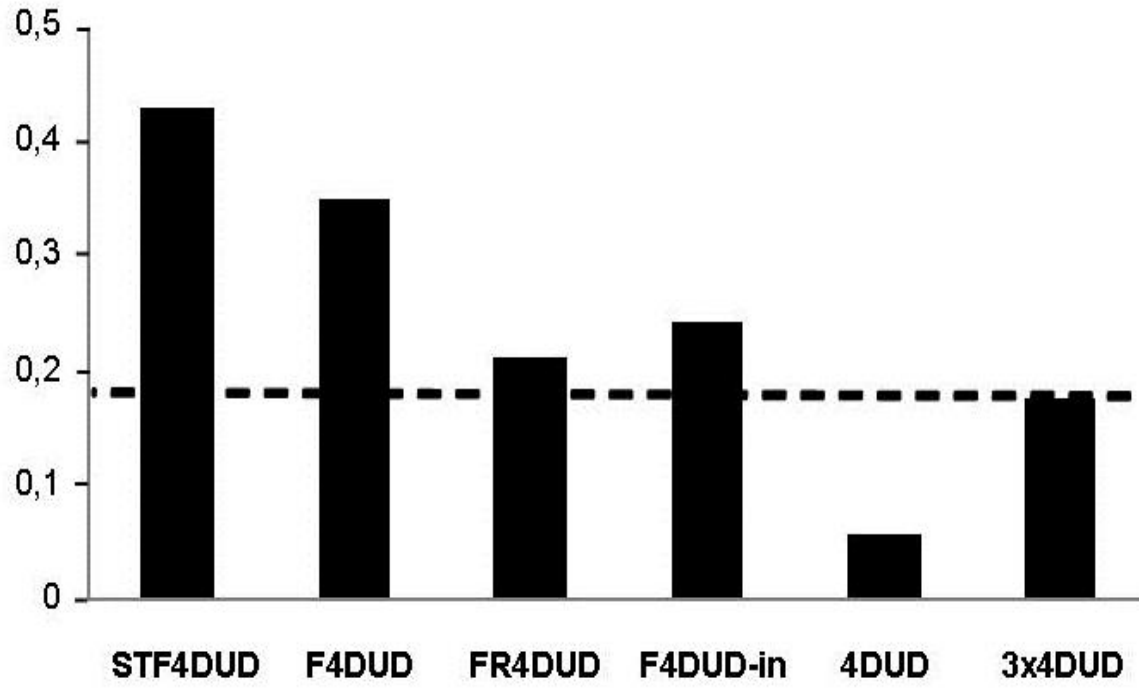


Figura 3

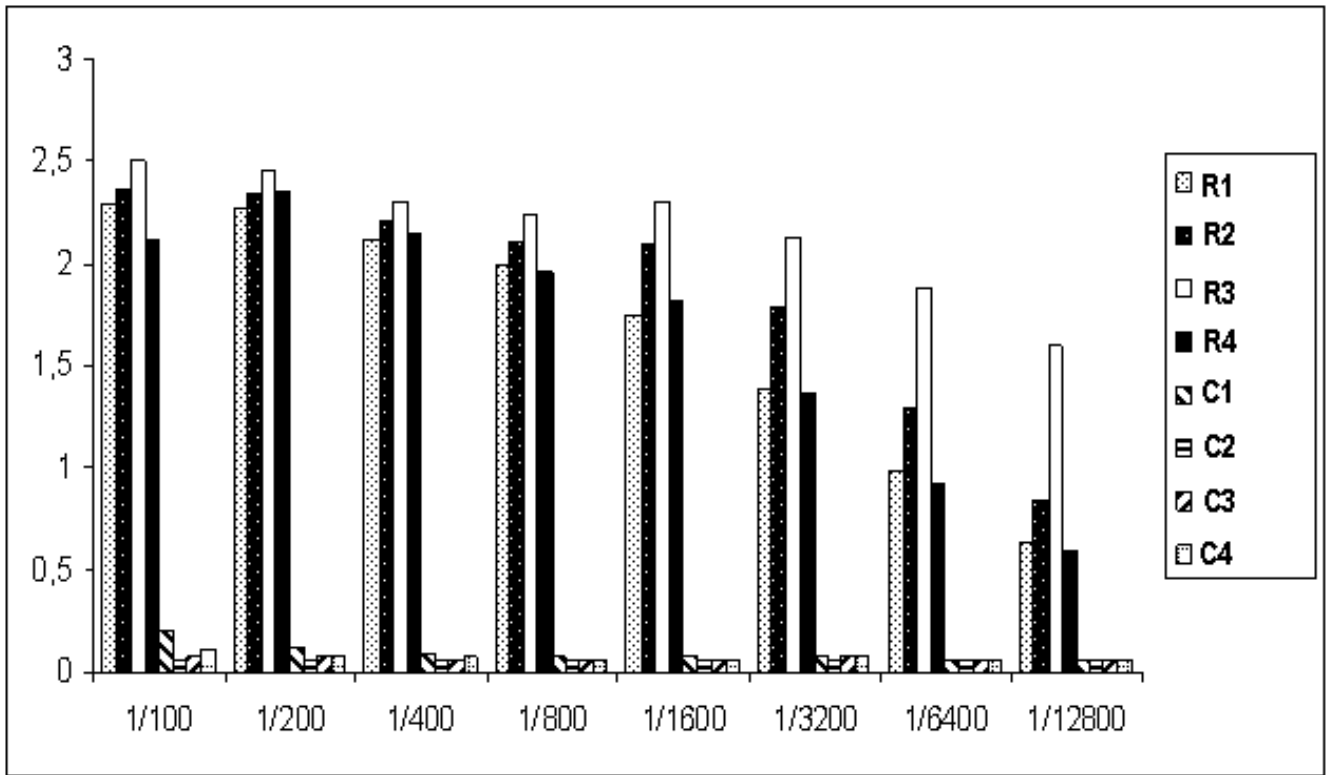


Figura 4

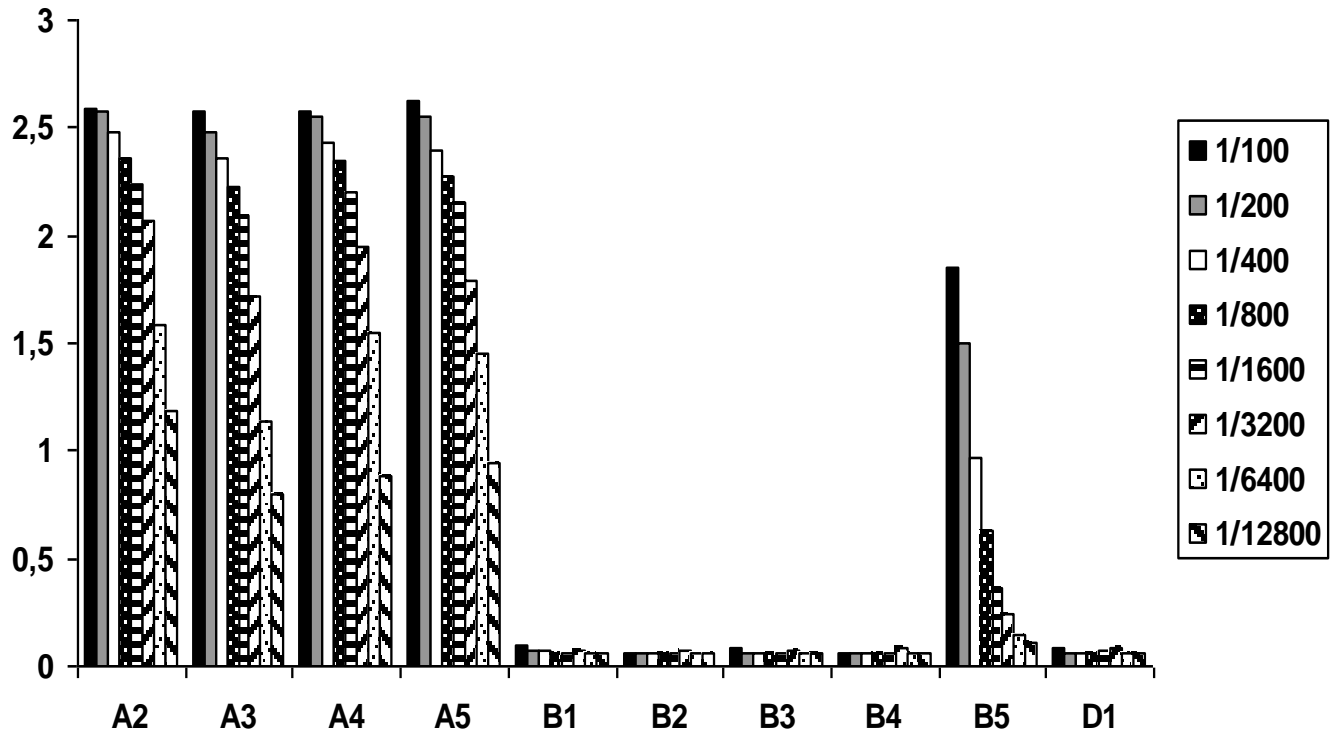


Figura 5

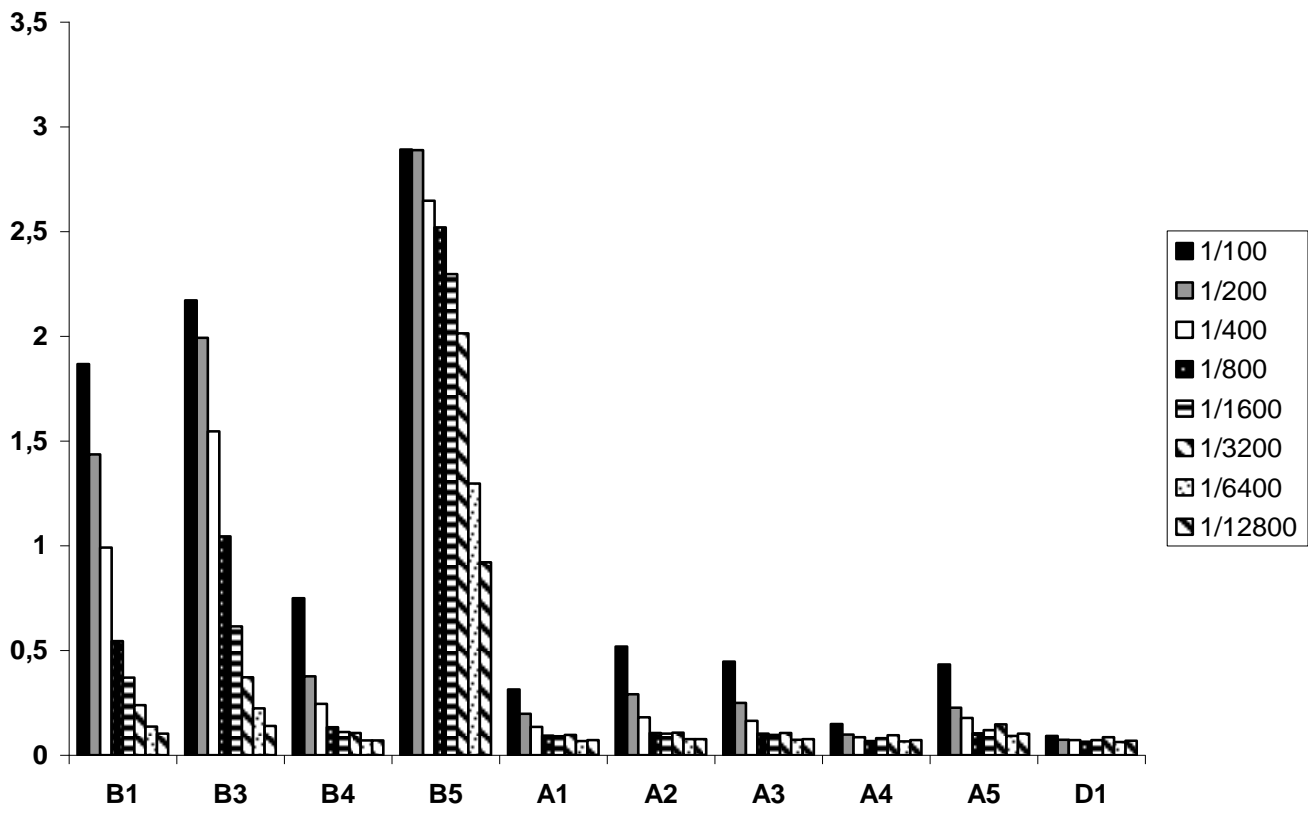


Figura 6

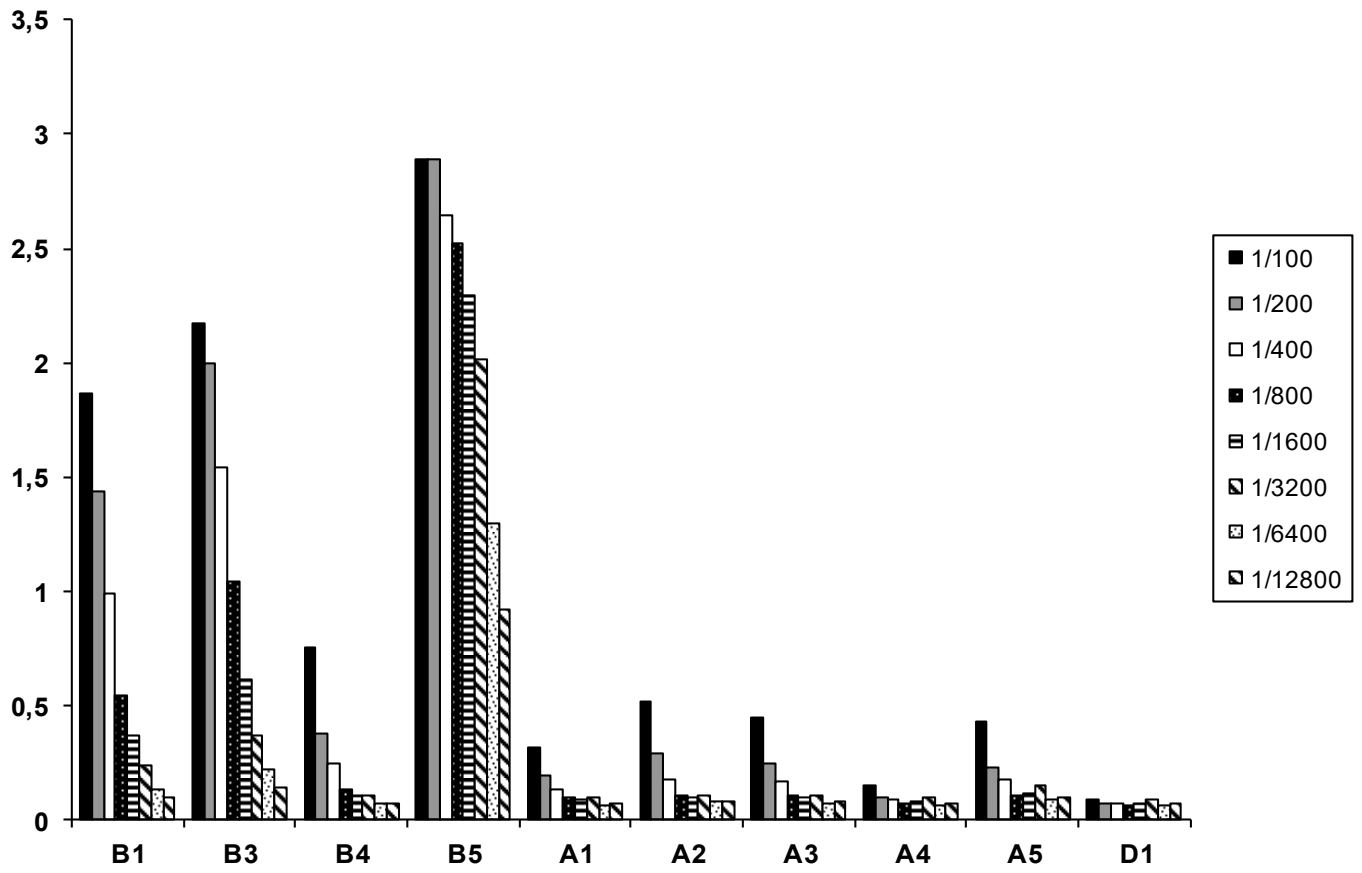


Figura 7



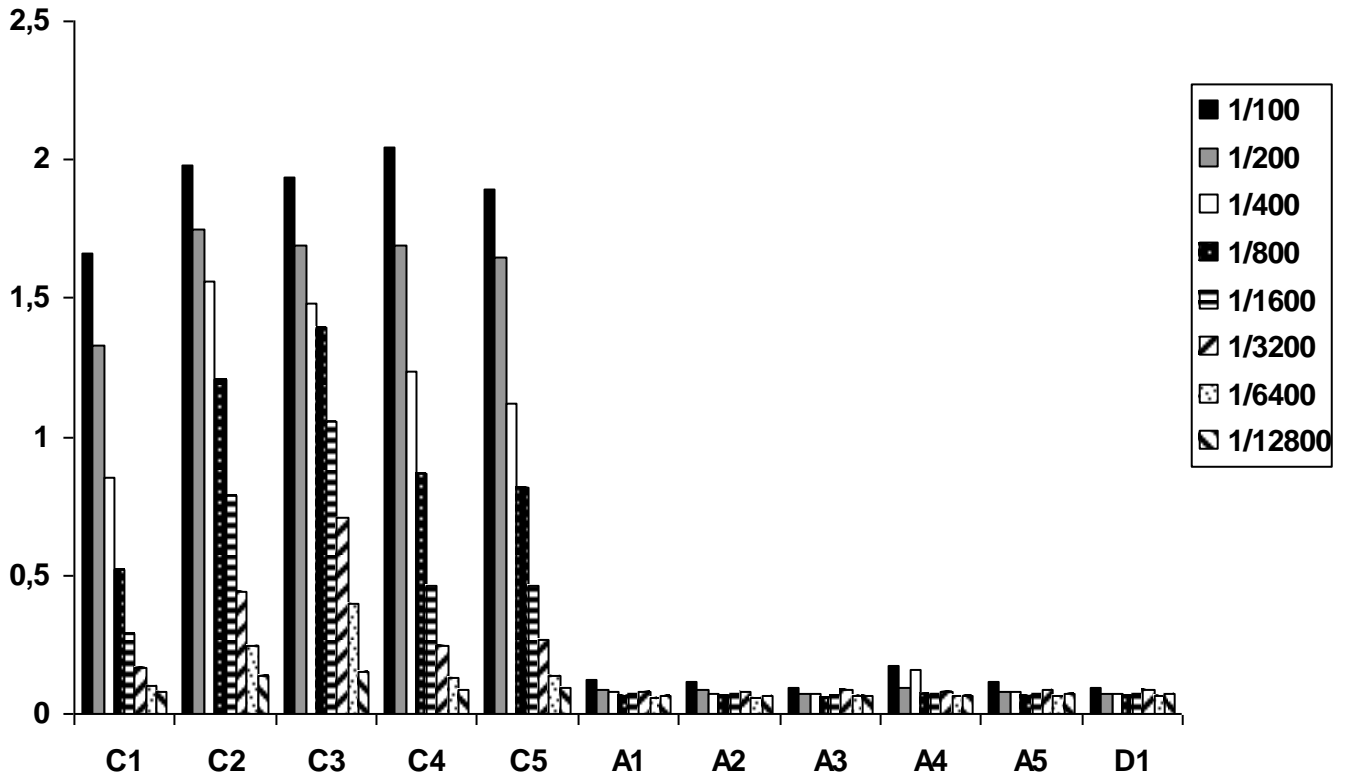


Figura 8

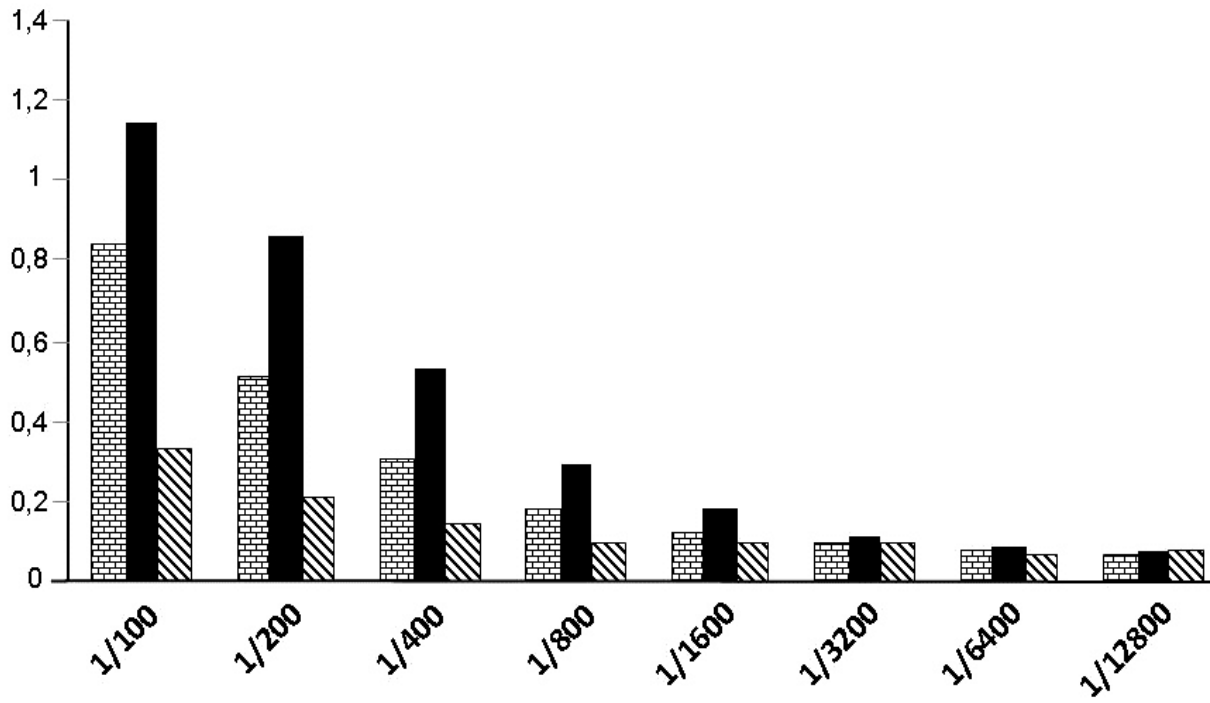


Figura 9

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- WO 2005070455 A [0006] [0086]
- EP 05630 A [0087]

**Documentos no literatura patente citados en la descripción**

- YONEKURA, K. ; S. MAKI-YONEKURA ; K. NAMBA. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 2003, vol. 424 (6949), 643-50 [0086]
- SAMATEY, F.A. et al. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 2001, vol. 410 (6826), 331-37 [0086]
- STECHER, B. et al. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycinpretreated mice. *Infect Immun*, 2004, vol. 72 (7), 4138-50 [0086]
- SMITH, K.D. et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol*, 2003, vol. 4 (12), 1247-53 [0086]
- RUMBO, M. et al. Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett*, 2006, vol. 580 (12), 2976-84 [0086]
- ROCK, F.L. et al. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95 (2), 588-93 [0086]
- JANSSENS, S.M ; R. BEYAERT. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*, 2003, vol. 16 (4), 637-46 [0086]
- AKIRA, S. ; K. TAKEDA ; T. KAISHO. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2001, vol. 2 (8), 675-80 [0086]
- HONKO, A.N.M ; S.B. MIZEL. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol Res*, 2005, vol. 33 (1), 83-101 [0086]
- AKIRA, S. ; K. TAKEDA. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol*, 2004, vol. 327 (6), 581-89 [0086]
- MCDERMOTT, P.F. et al. High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infect Immun*, 2000, vol. 68 (10), 5525-29 [0086]
- ANDERSEN-NISSEN, E. et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. vol. 102 (26). 9247-52 [0086]
- GALKIN, V.E. et al. Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. *Science*, 2008, vol. 320 (5874), 382-85 [0086]
- LEE SE ; KIM SY ; JEONG BC ; KIM YR ; BAE SJ ; AHN OS ; LEE JJ ; SONG HC ; KIM JM ; CHOY HE. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect Immun.*, 2006, vol. 74 (1), 694-702 [0086]
- AUDIBERT, F.M. ; L.D. LISE. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today*, 1993, vol. 14 (6), 281-84 [0086]
- LEVINE, M.M. ; M.B. SZTEIN. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat Immunol*, 2004, vol. 5 (5), 460-64 [0086]
- PEARSON, C.M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956, vol. 91 (1), 95-101 [0086]
- SCHIJNS, V.E. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol*, 2000, vol. 12 (4), 456-63 [0086]
- NEWTON, S.M. ; C.O. JACOB ; B.A. STOCKER. Immune response to cholera toxin epitope inserted in Salmonella flagellin. *Science*, 1989, vol. 244 (4900), 70-72 [0086]
- BEN-YEDIDIA, T. ; R. ARNON. Epitope-based vaccine against influenza. *Expert Rev Vaccines*, 2007, vol. 6 (6), 939-48 [0086]
- HULEATT, J.W. et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 2008, vol. 26 (2), 201-14 [0086]
- HONKO, A.N. et al. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun*, 2006, vol. 74 (2), 1113-20 [0086]
- MIZEL, S.B. et al. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, vol. 16 (1), 21-28 [0086]

- **BARGIERI, D.Y. et al.** New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. *Vaccine*, 2008, vol. 26 (48), 6132-42 [0086]
- **MCDONALD, W.F. et al.** A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *J Infect Dis*, 2007, vol. 195 (11), 1607-17 [0086]
- **FIERER, J. ; D.G. GUINEY.** Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. *J Clin Invest*, 2001, vol. 107 (7), 775-80 [0086]
- **WELLS, J.V. ; H.H. FUDENBERG ; I.R. MACKAY.** Relation of the human antibody response to flagellin to GM genotype. *J Immunol*, 1971, vol. 107 (6), 1505-11 [0086]
- **DALBY, T. et al.** Rapid decay of Salmonella flagella antibodies during human gastroenteritis: a follow up study. *J Microbiol Methods*, 2005, vol. 62 (2), 233-43 [0086]
- **BEN-YEDIDIA, T. ; R. ARNON.** Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunol Lett*, 1998, vol. 64 (1), 9-15 [0086]
- **MCDONOUGH, P.L. et al.** Interpretations of antibody responses to Salmonella enterica serotype enteritidis gm flagellin in poultry flocks are enhanced by a kinetics-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998, vol. 5 (4), 550-55 [0086]
- **NEMPONT, C. et al.** Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol*, 2008, vol. 181 (3), 2036-43 [0086]
- **HUU, N.B. et al.** Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, vol. 49, 367-75 [0086]
- **SHIEH, W.Y. et al.** Marinobacter lutaensis sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. *Can J Microbiol*, 2003, vol. 49 (4), 244-52 [0086]
- **YOON, J.H. et al.** Marinobacter flavimaris sp. nov. and Marinobacter daepoensis sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, vol. 54, 1799-803 [0086]
- **SHIVAJI, S. et al.** Marinobacter maritimus sp. nov., a psychrotolerant strain isolated from sea water off the subantarctic Kerguelen islands. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, vol. 55, 1453-56 [0086]
- **MARTIN, S. et al.** Marinobacter lipolyticus sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, vol. 53, 1383-87 [0086]
- **GORSHKOVA, N.M. et al.** Marinobacter excellens sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, vol. 53, 2073-78 [0086]
- **GREEN, D.H. et al.** Marinobacter algicola sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, vol. 56, 523-27 [0086]
- **GÓMEZ-PUERTAS, P. et al.** The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 1998, vol. 243 (2), 461-71 [0086]
- **ALONSO, C. et al.** African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol*, 2001, vol. 75 (20), 9819-27 [0086]
- **ALTSCHUL, S.F. et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25 (17), 3389-402 [0086]
- **ALTSCHUL, S.F. et al.** Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*, 2005, vol. 272 (20), 5101-09 [0086]
- **LARKIN, M.A. et al.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, vol. 23 (21), 2947-48 [0086]