

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 486**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

A61K 39/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2010 PCT/EP2010/063921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011 WO11033129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2010 E 10757087 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2480240**

54 Título: **Bacterias Gram-negativas modificadas para su uso como vacunas**

30 Prioridad:

21.09.2009 EP 09305879

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2017

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cédex 13, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%);
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (25.0%) y
UNIVERSIDAD DE NAVARRA (25.0%)**

72 Inventor/es:

**GORVEL, JEAN-PIERRE;
ARCE GORVEL, VILMA;
IRIARTE, MAITE;
MORIYON, IGNACIO y
CONDE-ALVAREZ, RAQUEL**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 612 486 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

Bacterias Gram-negativas modificadas para su uso como vacunas

5 **Sector de la técnica**

La invención generalmente se refiere al campo de las bacterias Gram-negativas modificadas para su uso como vacunas.

10 **Estado de la técnica**

Las bacterias Gram-negativas son aquellas bacterias que no retienen el colorante cristal violeta en el protocolo de tinción Gram. Muchas especies de bacterias Gram-negativas son patógenas, significando que pueden causar enfermedad en un organismo hospedador. Esta capacidad patógena normalmente está asociada con ciertos componentes de las paredes celulares Gram-negativas, en particular, la capa de lipopolisacárido (también conocido como LPS o endotoxina).

20 LPS es un componente mayoritario de la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, que contribuyen mucho a la integridad estructural de las bacterias, y que protege la membrana de ciertas clases de ataque químico. LPS también incrementa la carga negativa de la membrana celular y ayuda a estabilizar toda la estructura de la membrana. LPS es una endotoxina, e induce a una fuerte respuesta de los sistemas inmunes animales normales. LPS además es un pirógeno exógeno (compuesto inductor de fiebre externa). LPS comprende tres partes: las cadenas laterales de polisacárido (O), un polisacárido central y lípido A.

25 El lípido A contiene ácidos grasos inusuales (por ejemplo, ácido hidroxi-mirístico) y está incrustado en la membrana externa mientras que el resto del LPS se proyecta desde la superficie. El lípido A es un disacárido con colas de ácido graso múltiples que se meten en la membrana. Cuando las células bacterianas se someten a lisis por el sistema inmune, se liberan fragmentos de membrana que contienen el lípido A en la circulación, causando fiebre, diarrea, y posible choque endotóxico mortal (también llamado choque séptico).

30 La cadena lateral de polisacárido se denomina el antígeno O de la bacteria. La cadena lateral O (antígeno O) es una cadena de polisacárido que se extiende desde el polisacárido central. La composición de la cadena lateral O varía entre diferentes cepas bacterianas Gram-negativas. Las cadenas laterales O fácilmente son reconocidas por los anticuerpos del hospedador, sin embargo, la naturaleza de la cadena fácilmente se puede modificar por las bacterias Gram-negativas para evitar la detección.

35 El oligosacárido central contiene azúcares inusuales (por ejemplo, KDO, ceto-deoxioctuloseonato y heptosa), pero poco se conoce con respecto a su papel. En particular, su papel en la virulencia nunca se ha estudiado directamente.

40 Numerosos LPS mutantes que inducen la inmunidad humoral a lipopolisacárido (LPS) se han propuesto como vacunas potenciales. Sin embargo, los LPS mutantes puros o bacterias que expresan LPS mutantes generalmente se consideran demasiado tóxicos para usarse como vacunas, en particular, en vista de sus fuertes efectos adversos, y, por tanto, hay una necesidad de nuevas vacunas que presenten una virulencia atenuada e induzcan una inmunidad humoral suficiente para asegurar la vacunación del hospedador.

La solicitud de patente WO93/16728 (Texas A. & M. Univ. Sys.) describe una vacuna frente a *Brucella abortus* que permite la diferenciación entre el ganado infectado con cepa silvestre y vacunado.

50 El documento de Gonzales y col. ("Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export". *PLoS One*. 2008, 23 de julio; 3(7)) describe mutantes de *Brucella melitensis* cuyos LPS son defectuosos en el polisacárido O o núcleo y defectuosos en el polisacárido O.

55 **Objeto de la invención**

Los inventores han encontrado que, modificando una estructura particular del núcleo del LPS de bacterias Gram-negativas, es posible obtener cepas que tienen una virulencia atenuada, pero inducen una inmunidad humoral suficiente para asegurar la vacunación del hospedador. De hecho, los inventores han descubierto que glicosiltransferasas particulares implicadas en la síntesis del núcleo del LPS tienen un papel crítico en la virulencia de las bacterias Gram-negativas. Cuando se inactiva al menos una de estas glicosiltransferasas, el LPS modificado sintetizado por las bacterias Gram-negativas inducen una fuerte respuesta inmune del hospedador y su vacunación. Además, los inventores han demostrado más que la administración a un hospedador de un LPS producido por bacterias Gram-negativas en las que al menos una de dichas glicosiltransferasas está inactivada induce una respuesta inmune no específica y, por tanto, se puede usar como adyuvante para estimular el sistema inmune.

Descripción detallada de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

- 5 Un objeto de la invención concierne a una vacuna que comprende una bacteria del género *Brucella* que lleva un gen inactivado que codifica una glicosiltransferasa implicada en la síntesis del núcleo del LPS de dicha bacteria Gram-negativa,
- 10 en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, u sus homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 60 %, más particularmente al menos 70 %, más particularmente al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO:1, y
- 15 en donde dicho gen inactivado que codifica una glicosiltransferasa implicada en la síntesis del núcleo del LPS de dicha bacteria Gram-negativa da como resultado la síntesis de un LPS que tiene un núcleo modificado.
- 20 Los inventores han mostrado que la glicosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 es una glicosiltransferasa implicada en la síntesis de una estructura ramificada particular del núcleo del LPS de *Brucella abortus*. Los inventores han llamado a esta glicosiltransferasa BABLpcC. En particular, los inventores han mostrado que, al contrario que todos los mutantes del núcleo de LPS descritos hasta la fecha que inducen la delección del núcleo y de la cadena O del LPS (Gonzales y col.; *PLOS one*, julio de 2008, vol. 3, número 7, e2760), las bacterias Gram-negativas mutantes según la invención presentan un LPS que carece de parte del núcleo pero conserva una cadena O intacta. Estos resultados evidencian que *Brucella abortus* posee un núcleo de LPS ramificado, el cual se desconocía hasta la fecha (véase Fig. 10, que da una estructura propuesta del núcleo del LPS de *Brucella abortus*). Sin querer quedar ligado a teoría alguna, se cree que esta estructura ramificada del núcleo del LPS en las bacterias de tipo natural es importante para evitar el reconocimiento por inmunidad innata. Por consiguiente, las bacterias Gram-negativas mutantes según la invención desencadenan una respuesta inmune más intensa y protectora y, por tanto, constituyen vacunas muy prometedoras.

Además de la BABLpcC de *Brucella abortus*, los inventores también han mostrado que las glicosiltransferasas homólogas existen en otros organismos. Como resultado, es altamente creíble que la estructura particular del núcleo del LPS de *Brucella abortus* existe en otro organismo. Los inventores además han mostrado que estas proteínas homólogas tienen una secuencia de aminoácidos que presentan un alto porcentaje de identidad con SEQ ID NO:1, de al menos 60 %, particularmente de al menos 70 %, más particularmente de al menos 80 %.

Ejemplos de glicosiltransferasas implicadas en la síntesis del núcleo del LPS y que tienen un alto porcentaje de identidad con BABLpcC están presentes en la tabla de a continuación:

Organismo	SEQ ID NO:	% identidad con SEQ ID NO: 1
<i>Bartonella quintana</i>	2	65
<i>Bartonella tribocorum</i>	3	64
<i>Bartonella bacilliformis</i>	4	61
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	5	85
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	6	85
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	7	63
<i>Bartonella henselae</i>	22	69

Además de la glicosiltransferasa de SEQ ID NO:1, los inventores han mostrado que otra glicosiltransferasa, que tiene la secuencia de SEQ ID NO:21, también está implicada en la síntesis de la estructura ramificada del núcleo del LPS de una bacteria Gram-negativa, *Brucella abortus*. Los inventores también han mostrado que las glicosiltransferasas homólogas existen en otros organismos, como se describió previamente para BABLpcC. Los inventores además han mostrado que estas proteínas homólogas tienen una secuencia de aminoácidos que presentan un porcentaje de identidad con SEQ ID NO:21 de al menos 50 %, particularmente de al menos 60 %, más particularmente de al menos 62 %.

Ejemplos de glicosiltransferasas implicadas en la síntesis del núcleo del LPS y que tienen un porcentaje de identidad con SEQ ID NO:21 de al menos 50 %, particularmente de al menos 60 %, más particularmente de al menos 62 % están presentadas en la tabla de a continuación:

Organismo	SEQ ID NO:	% de identidad con SEQ ID NO:21
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	23	62
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	24	62
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	25	57

En otra realización particular, la invención también concierne a la vacuna según la invención en donde un gen que codifica una proteína implicada en la síntesis del polisacárido O del LPS está inactivado. De hecho, además de la inactivación de los genes codificadores de glicosiltransferasas implicados en la síntesis de la estructura ramificada

del núcleo del LPS, es de interés inactivar los genes implicados en la síntesis del polisacárido O del LPS. Tal "mutante doble", que carece de la estructura ramificada del núcleo y que carece parcialmente o totalmente de la cadena O, es útil para distinguir animales que están vacunados con él y animales que están infectados con la bacteria Gram-negativa que se da en la naturaleza (tipo natural), como se explica más adelante en la descripción.

- 5 Ejemplos de genes codificadores de una proteína implicada en la síntesis del polisacárido O del LPS son wboB, wboA, wbkE, wbkA, gmd, per, wzm, wzt, wbkB, wbkC, wbkF y wbkD (Gonzales y col.; *PLOS one*, julio de 2008, vol.3, número 7, e2760). Sus SEQ ID se dan en la tabla de a continuación:

Nombre del gen	Función de la proteína prevista	SEQ ID de aminoácidos
wboB	Manosil (perosaminil) transferasa	8
wboA	Manosil (perosaminil) transferasa	9
wbkE	Manosil (perosaminil) transferasa	10
wbkA	Manosil (perosaminil) transferasa	11
gmd	GDP-manosa deshidratasa	12
per	Perosamina sintetasa	13
wzm	Transportador ABC	14
wbkF	Undecaprenil-glicosiltransferasa	15
wbkD	Epimerasa/deshidratasa	16
wzt	Transportador ABC	26
wbkB	Sintetasa	27
wbkC	Formiltransferasa	28

- 10 Por consiguiente, en una realización de la invención, dicha proteína implicada en la síntesis del polisacárido O del LPS se selecciona así entre el grupo que comprende las proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28 o sus homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50 %, particularmente al menos 60 %, más particularmente al menos 70 %, incluso particularmente al menos 80 % y lo más particularmente al menos 90 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que comprende SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28. La elección de un porcentaje de identidad de al menos 50 % no es arbitraria: este porcentaje de identidad se ha encontrado por los inventores para las secuencias homólogas de SEQ ID NO:8 a 16, 26 a 28 en la cepa particular *Yersinia enterocolitica* O:9.

- En una realización particular de la invención, dicha proteína implicada en la síntesis del polisacárido O del LPS es una perosamina sintetasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 o un homólogo de la misma que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13. Este alto porcentaje de identidad (de al menos 90 %) generalmente se encuentra en las cepas del género *Brucella*.

- Según la invención, por "gen inactivado" se quiere decir un gen que codifica o bien una proteína no funcional o no proteína en absoluto. Según la invención la inactivación de un gen se puede llevar a cabo por diversos métodos conocidos por el experto en la técnica. Ejemplos de métodos para inactivar un gen son el noqueo (*knock out*)₁ y particularmente la mutagénesis dirigida o la recombinación homóloga, como se describe en Conde-Alvarez R. y col., *Cell Microbiol*, agosto de 2006;8(8):1.322-35. Un método particular para inactivar un gen según la invención está descrito en la sección experimental.

- 35 Ejemplos de bacterias Gram-negativas son bacterias del género *Brucella*, *Bartonella*, *Ochrobactrum* y *Agrobacterium*. Las bacterias Gram-negativas según la invención son del género *Brucella*.

- Por tanto, la vacuna según la invención comprende una bacteria del género *Brucella*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, o sus homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 60 %, particularmente al menos 70 %, más particularmente al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO:1.

- Especies particulares del género *Brucella* según la invención son *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella ceti*, *Brucella microti*, y *Brucella canis*.

- 45 Especies particulares del género *Ochrobactrum* según la descripción son *Ochrobactrum anthropi* y *Ochrobactrum intermedium*.

- Además, la descripción concierne, en particular, a una bacteria *Ochrobactrum anthropi*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO:1, o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 o una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos 62 % de identidad con SEQ ID NO:21.

Además, la descripción concierne, en particular, a una bacteria *Ochrobactrum intermedium*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % identidad con SEQ ID NO:1 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 62 % de identidad con SEQ ID NO:21.

Especies particulares del género *Bartonella* según la descripción son *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella tribocorum*, *Bartonella bacilliformis*.

La descripción también concierne, en particular, a una bacteria *Bartonella henselae*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 69 % de identidad con SEQ ID NO:1.

La descripción también concierne, en particular, a una bacteria *Bartonella quintana*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65 % de identidad con SEQ ID NO:1.

La descripción incluso concierne, en particular, a una bacteria *Bartonella tribocorum*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 64 % de identidad con SEQ ID NO:1.

La descripción también concierne, en particular, a una bacteria *Bartonella bacilliformis*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 61 % de identidad con SEQ ID NO:1.

Especies particulares del género *Agrobacterium* según la descripción son *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium radiobacter*.

Por tanto, la descripción concierne, en particular, a una bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 63 % de identidad con SEQ ID NO:1.

Además, la descripción concierne, en particular, a una bacteria *Agrobacterium radiobacter*, en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que comprende las glicosiltransferasas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 57 % de identidad con SEQ ID NO:21.

Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de la identidad de secuencia se refiere a comparaciones entre secuencias de aminoácidos, y se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos (*gaps*)) en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se puede calcular determinando el número de posiciones en las que el residuo de aminoácidos idéntico se da en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Alternativamente, el porcentaje se puede calcular determinando el número de posiciones en las que o bien el residuo de aminoácidos idéntico se da en ambas secuencias o un residuo de aminoácidos está alineado con un hueco para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Los expertos en la técnica aprecian que hay muchos algoritmos establecidos para alinear dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede conducir, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la investigación por el método de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2.444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático GCG Wisconsin), o mediante inspección visual (véase generalmente, "Current Protocols in Molecular Biology", F.M. Ausubel y col., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Suplemento) (Ausubel)). Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar la identidad de secuencia en porcentaje y la similitud de secuencia son los algoritmos

BLAST y BLAST 2.0, que están descritos en Altschul y col., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul y col., 1977, *Nucleic Acids Res.* 3.389-3.402, respectivamente. El programa informático para realizar los análisis BLAST están públicamente disponibles en la página de internet del *National Center for Biotechnology Information*. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencia de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia interrogante, que o bien empareja o satisface alguna puntuación de umbral T valorada positiva cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabra de vecindad (Altschul y col., supra). Estas coincidencias (hits) de palabra de vecindad iniciales actúan como simiente para investigaciones iniciadoras para encontrar los HSPs más largos que los contengan. A continuación, se extienden las coincidencias de palabra en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como se pueda incrementar la puntuación de alineamiento acumulativo. Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabra en cada dirección se para cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo decae por la cantidad X de su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuo de puntuación negativa; o se alcance el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTP (para las secuencias de aminoácidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10.915). La determinación de secuencia de alineamiento como ejemplo y el % de identidad de secuencia puede emplear los programas BESTFIT o GAP en el paquete informático GCG Wisconsin (Accelrys Madison WI), usando parámetros por defecto proporcionados.

La invención también concierne a las aplicaciones terapéuticas de los mutantes Gram-negativos según la invención. En particular, la invención se refiere a la bacteria Gram-negativa según la invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal.

En otro aspecto, la invención se refiere a vacunas que comprenden una bacteria Gram-negativa según la invención.

De hecho, los inventores han mostrado que las bacterias según la invención se pueden usar como vacunas vivas.

Por tanto, la invención se refiere a la bacteria Gram-negativa según la invención, para su uso en un método para vacunar el cuerpo humano o animal frente a una enfermedad causada por el tipo natural de dicha bacteria Gram-negativa.

La invención también se refiere a un método para tratar, en particular vacunar, un sujeto frente a una enfermedad causada por una bacteria Gram-negativa, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha bacteria Gram-negativa modificada según la invención.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", usado en el presente documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al cual se aplica tales términos.

Tal como se usa en el presente documento, "sujeto" se refiere a un ser humano o animal que puede beneficiarse de la administración de una bacteria Gram-negativa como se cita en el presente documento.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una bacteria Gram-negativa como se describió previamente, se quiere decir una cantidad suficiente para tratar la enfermedad, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Una vacuna se define en el presente documento como un agente biológico que es capaz de proporcionar una respuesta protectora en un animal al cual se ha administrado la vacuna y es incapaz de causar enfermedad grave. La vacuna estimula la producción del anticuerpo o la inmunidad celular frente al patógeno que causa la enfermedad; por tanto, la administración de la vacuna da como resultado inmunidad a la enfermedad.

Según la invención, por un "tipo natural" se quiere decir una bacteria Gram-negativa en donde los genes previamente descritos están activos.

Si se desea, las vacunas vivas de acuerdo con la invención pueden contener un adyuvante. Ejemplos de compuestos y composiciones adecuadas con actividad adyuvante son bien conocidos en la técnica. Además, las secuencias de ácidos nucleicos codifican polipéptidos para aplicaciones farmacéuticas o de diagnóstico, en particular se pueden incorporar en la vacuna inmunomoduladores tales como linfoquinas, interferones o citoquinas.

Una vacuna según la invención se puede preparar mediante métodos convencionales tales como los comúnmente usados para las vacunas vivas atenuadas comercialmente disponibles.

La vacuna se puede administrar por inoculación o inyección intramuscular, intradérmica, subcutánea o intranasal en una cantidad que es eficaz para proteger el animal frente a exposición a una cepa virulenta de bacteria Gram-negativa. Esta cantidad puede variar según el animal a inocular, tomando en consideración el tamaño y el peso del

animal. La vacuna según la invención comprende una dosis eficaz de la bacteria Gram-negativa mutante del género *Brucella* como componente activo, es decir, una cantidad suficiente de bacteria Gram-negativa mutante que inducirá inmunidad en los animales vacunados, frente a la exposición a la bacteria Gram-negativa virulenta del género *Brucella*. La inmunidad se define en el presente documento como la inducción de un nivel mayor significativo de protección en una población de animales frente a mortalidad y síntomas clínicos después de la vacunación en comparación con un grupo no vacunado. En particular, la vacuna según la invención previene una gran proporción de animales vacunados frente a la existencia de síntomas clínicos de la enfermedad y mortalidad.

Cuando se proporciona a un paciente (humano o animal) vacunas de bacterias vivas, la dosis de bacterias administradas variará dependiendo de tales factores como la vía de administración, especie del paciente, peso, altura, sexo, condición médica general, historial médico anterior, etc. En general, es deseable proporcionar al receptor una dosis de las anteriores bacterias que esté en el intervalo de aproximadamente 10^5 ufc/kg a 10^8 ufc/kg (peso corporal del paciente), aunque se puede administrar una dosis inferior o superior.

Además de la bacteria Gram-negativa mutante, la invención también puede incluir vacunas de combinación que comprenden una cepa de vacuna capaz de inducir protección frente a otro patógeno.

Las bacterias Gram-negativas de la invención pertenecen al género *Brucella*. Por tanto, la invención se refiere a estas bacterias Gram-negativas para su uso en un método para el tratamiento de brucelosis en el cuerpo humano o animal. De hecho, las brucellas son parásitos intracelulares facultativas que infectan una diversidad de mamíferos y tienen un gran impacto en la salud animal y humana por todo el mundo. Estas bacterias Gram-negativas carecen de factores de virulencia típicos y se comportan como parásitos sigilosos que evitan la detección por inmunidad innata en el comienzo de la infección, retardando así una respuesta celular adaptable y haciendo posible para este patógeno alcanzar nichos intracelulares resguardados. Esta capacidad no está relacionada con una inducción de citoquinas reguladoras tales como IL-10 sino con el fallo de los receptores de reconocimiento de patógeno (PRR) de inmunidad innata para identificar las moléculas superficiales de *Brucella* que normalmente soportan los patrones moleculares asociados con patógeno cognado (PAMP) (Barquero-Calvo E. y col. (2007) *PLoS ONE* 2: e631), y en particular el LPS de estas cepas. Los inventores han mostrado que las cepas de la invención, con carencia de una parte particular del núcleo del LPS inducen una respuesta inmune fuerte y, por tanto, son adecuadas para su uso como vacuna frente a brucelosis.

Tal como se describió previamente, en una realización particular, la invención también concierne a bacterias Gram-negativas que carecen de la estructura ramificada del núcleo y que carecen particularmente o totalmente de la cadena O. Estas bacterias doble mutantes son útiles para distinguir animales que están vacunados con dichas bacterias doble mutantes y animales que están infectados con las bacterias Gram-negativas de tipo natural.

Por tanto, la invención concierne a un método para determinar la infección de bacterias Gram-negativas en un animal que comprende la etapa de examinar una muestra obtenida a partir de dicho animal para la presencia o ausencia de anticuerpos reactivos con los epítomos inmunodominantes (C, C/Y, A y M o combinaciones de los mismos) de la cadena O (Alton, G.G. y col. 1988, "Techniques for the brucellosis laboratory" - INRA, Paris, Francia; Gall, D. y col. 2004, *Rev. Sci. Tech.* 23:989-1002). La muestra del animal usado en este método puede ser cualquier muestra en la que dichos anticuerpos se pueden detectar, por ejemplo, en una muestra de sangre, suero o tejido.

La presencia o ausencia de anticuerpos se puede detectar mediante cualquier inmunoensayo conocido por el experto en la técnica. El diseño de este inmunoensayo puede variar. Por ejemplo, el inmunoensayo puede estar basado en la competición o la reacción directa. Además, los protocolos pueden usar soportes sólidos o pueden usar material celular. La detección del complejo anticuerpo-antígeno puede implicar el uso de anticuerpos marcados; las marcas pueden ser, por ejemplo, enzimas, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o de colorante. Métodos adecuados para la detección de los epítomos anteriormente mencionados en la muestra incluyen, por ejemplo, el ensayo por inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), ensayos inmunofluorescentes y análisis de transferencia tipo Western.

En otro aspecto, la descripción concierne a un lipopolisacárido aislado obtenible de una bacteria Gram-negativa según la invención. De hecho, los inventores han encontrado que el LPS modificado producido por las bacterias Gram-negativas según la invención estimulan una producción no específica de citoquinas, en particular de IL-12 y TNF α , por células detriticas (Fig. 6B) en el ratón.

El LPS se puede extraer de las bacterias Gram-negativas según la invención siguiendo cualquier método conocido por el experto en la técnica como, por ejemplo, el método descrito en Garin-Bastuji B. y col. (1990) *J. Clin. Microbiol.* 28:2.169-2.174; Leong D. y col. (1970) *Infection and Immunity* 1:174-182; y Velasco, J., J. A. Bengoechea, K. Brandenburg, B. Lindner, U. Seydel, D. González, U. Zähringer, E. Moreno, y I. Moriyón. 2000. *Brucella abortus* y su relativo filogenético más cercano, *Ochrobactrum spp.*, difieren en la permeabilidad de la membrana exterior y la resistencia del péptido catiónico. *Infect. Immun.* 68:3.210-3.218.

Como resultado, el LPS modificado según la descripción se puede usar en un método para estimular el sistema inmune del cuerpo humano o animal.

La descripción concierne a un adyuvante que comprende un lipopolisacárido según la descripción.

Además, la descripción concierne a una vacuna que comprende un antígeno y un adyuvante en donde dicho adyuvante comprende un lipopolisacárido según la descripción. De acuerdo con esta realización, el LPS según la descripción aumenta la respuesta inmune inducida por el antígeno comprendido en la vacuna.

En otra realización de la descripción, el LPS según la descripción está conjugado con una molécula vehículo, para aumentar su inmunogenicidad. Por tanto, la descripción concierne a un conjugado que comprende un lipopolisacárido obtenible de una bacteria Gram-negativa según la invención ligado a una molécula vehículo. De acuerdo con esta realización, el conjugado LPS/vehículo induce una respuesta inmune específica frente al LPS y así se puede usar como vacuna. Ejemplos no limitantes de moléculas vehículo son las proteínas vehículos, tales como el toxoide del tétanos o el toxoide de la difteria.

Aspectos y ventajas adicionales de esta invención se describirán en las siguientes figuras y ejemplos, los cuales se deberían considerar como ilustrativos y no limitantes del alcance de esta solicitud.

Descripción de las figuras

Fig. 1: La *BABΔlpcC* tiene un defecto en el núcleo del LPS. La SDS-PAGE de extractos con fenol-agua y el análisis de transferencia tipo Western de extractos de SDS-proteinasa K de LPS de las cepas *BAB-parental* (Ba wt-LPS), *BABΔlpcC* (Ba LpcC-LPS), y *BABΔlpcCp/lpcC* (Ba LpcC-compl-LPS). Los Moabs usados son Cby-33H8 (a epitopo C/Y de la cadena O) y A68/24D08/G09.

Fig. 2: Estado agregado de Ba wt-LPS y Ba LpcC-LPS. **(A)**, tamaño del agregado de las fracciones de LPS mayores y menores en dependencia de la concentración medida por la dispersión de la luz. **(B)**, determinación de la concentración del agregado crítica por emisión de fluorescencia de NPN (el incremento en fluorescencia causado por la partición de NPN en los agregados comienza a 10 μg/ml para tanto Ba wt-LPS como Ba LpcC-LPS). Se obtuvieron los mismos valores para las fracciones menores.

Fig. 3: *BABΔlpcC* muestra sensibilidad incrementada a la acción mortal del suero normal que se relaciona con el defecto de LPS. **(A)**, supervivencia de *BAB-parental*, *BABΔlpcC*, *BABTn5::per* y *BABTn5::bvrR* después de la incubación en suero no inmune durante 90 min. Los datos son la media ± error estándar de tres medidas simultáneas (los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes); **(B)**, transición de fase gel a líquido cristalino ($\beta \leftrightarrow \alpha$) de las cadenas de hidrocarburo de Ba wt-LPS y Ba LpcC-LPS en presencia o ausencia de suero humano normal. Se traza la posición del pico de la vibración de tensión simétrica de los grupos metileno vs(CH₂) en función de la temperatura.

Fig. 4: *BABΔlpcC* muestra sensibilidad incrementada a péptidos bactericidas policatiónicos que se relaciona con el defecto de LPS. **(A)**, las MIC determinadas por el ensayo E (colistina) o el método de dilución en serie (polimixina B, poli-L-ornitina, poli-L-lisina). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos en los que *BAB-parental*, *BABΔlpcC* se ensayaron simultáneamente, **(B)**, transición de fase gel a líquido cristalino ($\beta \leftrightarrow \alpha$) de las cadenas de hidrocarburo de Ba wt-LPS y Ba LpcC-LPS en presencia o ausencia de polimixina B en una relación molar 1:0,1 de LPS:PMB. Se traza la posición del pico de la vibración de tensión simétrica de los grupos metileno vs(CH₂) en función de la temperatura.

Fig. 5: *BABΔlpcC* se atenúa en células dendríticas pero no en macrófagos. **(A)**, cinéticas de supervivencia intracelular y replicación de *BAB-parental*, *BABΔlpcC* y *BABΔlpcC-plpcC* en BMDM (panel izquierdo) o BMDC (panel derecho) (un mutante *virB10::Gm* atenuado en ambos tipos de células está incluido como referencia; cada punto representa la media ± error estándar de pocillos por triplicado de un experimento representativo [se realizaron tres experimentos independientes]); **(B)**, imágenes confocales de BMDC infectadas con GFP de *BAB-parental* o GFP de *BABΔlpcC* (gris claro) marcado con Moabs a o bien calnexina, o LAMP I (ambos en gris oscuro) 24 h después de la infección.

Fig. 6: *BABΔlpcC* estimula una liberación de citoquina comparativamente incrementada en BMDC infectada que es comparable a la actividad dependiente de TLR4 de la Ba LpcC-LPS. **(A)**, niveles de citoquina en los sobrenadantes (24 h de incubación) de BMDC infectada (panel izquierdo) o estimulada con LPS (panel derecho) de ratones de tipo silvestre TLR; **(B)**, niveles de citoquina en los sobrenadantes (24 h de incubación) de BMDC estimulada con LPS de ratones TLR ko. Los códigos para las bacterias y LPS son los usados en el texto. Los valores corresponden a media ± error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Fig. 7: Ba LpcC-LPS muestra una unión comparativamente incrementada a h-MD2.

Fig. 8: *BABΔlpcC* estimula una maduración de célula dendrítica. La figura muestra los porcentajes de BMDC infectadas con o bien *BAB-parental*, *BABΔlpcC* o *S. typhimurium* que contienen DALIS.

Fig. 9: *BABΔlpcC* atenuada en ratones. Las gráficas muestran las cinéticas de infección en los bazos (panel izquierdo) y los pesos del bazo (panel derecho) de los ratones inoculados con *BAB-parental* o *BABΔlpcC* (cada punto es la media ± error estándar [n=5] del logaritmo de UFC). Las gráficas de la vacuna de referencia *B. abortus* S19 y de *BABTn5::per* deficiente en cadena O obtenida en un experimento independiente se añaden como referencia.

Fig. 10: La representación propuesta del núcleo de LPS de *Brucella*. En esta representación, la estructura ramificada del núcleo está representada con dos unidades de azúcar (alfa-D-Manp y beta-D-GlcpN). El núcleo está ligado a un lípido A por una unidad de azúcar Kdo I, mientras que está ligado a la cadena O a través de un alfa-D-Glcp. Esta representación se da solamente con un propósito de comprensión y no ata a los inventores a

ninguna teoría puesto que hasta la fecha la estructura exacta del núcleo es aún desconocida.

Fig. 11: Análisis de regresión de las cinéticas del aclaramiento del bazo de BAB Δ lpcC y de su cepa parental. Las correspondientes ecuaciones de regresión ($y = -0,27 x + 6,81$ [$R = 0,77$]) e $y = -0,07 x + 6,85$ [$0,95$]) predicen un tiempo de aclaramiento de 25,2 y 93,8 semanas para BAB Δ lpcC y BAB-parental, respectivamente. Cada punto representa la media \pm error estándar del logaritmo de UFC en los bazos de cinco animales.

Ejemplos

En la siguiente descripción, todos los experimentos biológicos moleculares para los cuales no se da protocolo detallado se realizan según los protocolos estándar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento. Las cepas bacterianas y los plásmidos usados están enumerados en la Tabla 1:

Cepa/plásmidos	Características relevantes	Referencia/Fuente
Brucella abortus		
<i>B. abortus</i> 2308	Tipo natural, virulenta, biotipo 1, S-LPS	
BAB-parental	Mutante espontáneo NaI ^R de cepa de <i>B. abortus</i> 2308	(Sangari y AgYero 1991)
BAB Δ lpcC	BAB-parental lpcC Δ 16-308	Este trabajo
BAB Δ lpeG-plpcC	Plásmido plpcC que alberga BAB Δ lpcC	Este trabajo
BABTn5::por	2308 NaR per::Tn5; LPS rugoso	(Monreal y col. 2003)
virB10::Gm	2308 NaR Gm ^R , mutante no polar de virB10	(Sieira y col. 2000)
BAB-Tn5::bvrR	BAB-parental bvrR::Tn5, S-LPS; completamente atenuado; sensible a suero normal	Mutant 65.21 en Sola-Landa y col. 1998)
GFP de BAB-parental	pBBR1MCS-2 GFP Km ^R que alberga BAB-parental	Este trabajo
GFP de BAB Δ lpcC	pBBR1MCS-2 GFP Km ^R que alberga BAB Δ lpcC	Este trabajo
<i>B. abortus</i> S19		Dr. J.M. Blasco, C.I.T.A Gobierno Aragón
E. coli		
S17-1	Emparejamiento cepa con plásmido RP4 insertado en el cromosoma	(Simon y col. 1983)
Top10 FÖ	F - lacIq Tn 10 (Tetr) mcrA Δ (mm-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1alaD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen
Plásmidos		
pCR2.1	Vector de clonación	Invitrogen
pJQK	Derivado de pJQ200KS +; Km ^R ; Gm ^S	(Scupham y Triplett, 1997)
pRH001	Derivado de pMR10 Km ^R ; Cm ^R	(Hallez y col. 2007)
pRCI-23	1019 pb del ADN cromosómico de BAB-parental que contiene el alelo de delección lpcC, generado por PCR y clonado en pCR2.1	Este trabajo
pRCI-26	Fragmento BamH I-Xba I de pRCLI-23 clonado en los correspondientes sitios de pJQK	Este trabajo
pDONR201 BMEI0509	ADN cromosómico de <i>B. melitensis</i> que contiene el gen lpcC completo, generado por PCR y clonado en pDONR201 (Invitrogen)	(Dricot y col. 2004)
plpcC	Fragmento attL1 - attL2 de pDONR201 - BMEI0509 clonado en los sitios attR1 - attR2 de pRH 001	Este trabajo
pBBR1MCS-2GFP	Derivado pBBR1MC-2 que expresa el gen gfp-mut3 bajo el control del promotor lack	Dr. J.P. Gorvel, INSERM-CNRS, Marsella, Francia

Las bacterias se cultivaron de forma rutinaria en caldo o agar de soja triptico estándar o bien puro o suplementado con kanamicina a 50 μ g/ml, o/y nalidixico a 25 μ g/ml, o/y sacarosa al 5 %. Todas las cepas se almacenaron en leche desnatada a -80 °C.

Extracción de LPS y caracterización. La extracción de todo LPS de la célula mediante el protocolo de SDS-proteinasa K se realizó como se describió previamente (Garin-Bastuji B. y col., (1990) *J. Clin. Microbiol.* 28:2.169-2.174). Además, LPS se obtuvo mediante la precipitación de metanol de la fase fenol de un extracto de fenol-agua (Leong D. y col. (1970) *Infection and Immunity* 1:174-182). A continuación, se purificó esta fracción (10 mg/ml en NaCl 175 mM, NaN₃ al 0,05%, Tris-HCl [pH 7,0] 0,1 M) mediante digestión con nucleasas (50 μ g/ml cada DNasa-II tipo V, y RNasa-A [Sigma], 30 min a 37°C) y tres veces con proteinasa K (50 μ g/ml, 3 horas a 55°C), y se sometió a

ultracentrifugación (6 h, 100.000 x g) (Aragon V. y col. (1996) *J. Bacteriol.* 178: 1.070-1.079). A continuación, se separaron los lípidos libres (lípidos de ornitina y fosfolípidos) mediante una extracción cuatro veces con cloroformo-metanol. (2:1 [vol/vol]) (Velasco J. y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:3.210-3.218).

5 Los LPS se analizaron en geles de poliacrilamida al 15 o 18 % (relación acrilamida/metileno-bisacrilamida 37,5:1) en Tris-HCl-glicina y se tiñeron por el método de peryodato-plata alcalina (Tsai CM. y col. (1982) *Anal. Biochem.* 119:115-119). Para las transferencias tipo Western, los geles se sometieron a electrotransferencia sobre láminas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Alemania), bloqueadas con leche desnatada al 3 %
10 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 10 mM con Tween 20 al 0,05 % toda la noche, y se lavaron con PBS-Tween 20 al 0,05 %. Los sueros inmunes se diluyeron en el mismo tampón y, después de inoculación durante la noche a temperatura ambiente, las membranas se lavaron de nuevo. Se detectaron las inmunoglobulinas unidas con anti-inmunoglobulina de ratón de cabra conjugada con peroxidasa (Nordic) y 4-cloro-naftol-H₂O₂. Los anticuerpos monoclonales (Moabs) usados en este estudio eran Cby-33H8 (Ingenasa, Madrid, España), que reconoce el epitopo de cadena O C/Y, y A68/24D08/G09, A68/24G12/A08, y A68/3F03/D5 que reconocen epítomos del núcleo (Bowden R.A. y col. (1995) *Infection and Immunity* 63:3.945-3.952). El marcador del núcleo interno de LPS ácido 3-deoxi-D-manno-2-octulosónico (Kdo) se determinó por colorimetría mediante el método de ácido tiobarbitúrico que usa Kdo puro y deoxirribosa como patrones, con las modificaciones previamente descritas (Díaz-Aparicio E. y col. (1993) *J. Clin. Microbiol.* 31:3.136-3.141; Díaz-Aparicio E. y col. (1993) *J. Clin. Microbiol.* 31:3.136-3.141).

20 **Determinación del tamaño de agregado y concentración de agregación crítica de LPS.** El tamaño de agregado de los LPS se determinó mediante dispersión dinámica de la luz. Se prepararon suspensiones de solución madre de LPS a 1 mg/ml en agua purificada por osmosis inversa, desionizada y se sometieron a tres ciclos de calentamiento a 56 °C y enfriamiento a 4 °C para homogenizarlas. El día de uso, se prepararon diluciones en serie en el intervalo de
25 1 a 500 µg/ml y se filtraron a través de membranas Durapore® (PVDF) de unión a proteína baja, de 0,45 µm inmediatamente antes de la medición. Las medidas de la dispersión de la luz se llevaron a cabo en un equipo DynaPro a 37 °C usando un láser de 825 nm y ángulo de dispersión de 90 °C. Los datos se analizaron mediante el método de regularización en el programa informático Dynamics V6.

30 La concentración de agregación crítica de LPS se determinó mediante fluorescencia en estado estacionario usando N-fenil-1-naftilamina (NPN), una sonda fluorescente hidrófoba, cuyo rendimiento cuántico aumenta en ambientes hidrófobos. Se añadió NPN (500 µM en acetona) en 1 ml de agua para conseguir NPN a una concentración final de 15 µM en una cubeta de cuarzo de 1 cm óptica. A continuación, se añadieron diferentes volúmenes de una solución madre de LPS (desde 1 µg/ml a 100 µg/ml, concentración final). La fluorescencia se midió (excitación, 350 nm; barrido de emisión, 380 nm a 600 nm) en el equipo Edinburch FLS920 a 37 °C.

35 **Determinación de la fluidez de la cadena de acilo de LPS.** Se determinó la transición de las cadenas de acilo de LPS desde un estado bien ordenado (fase gel) a un estado fluido (fase líquido cristalino) a una temperatura específica de lípido (T_c) mediante espectroscopia de infrarrojo transformada de Fourier. Se analizó una banda de vibración específica, la vibración de tensión simétrica de los grupos metileno vs(CH₂) alrededor de 2,850 cm⁻¹, puesto que su posición pico es una medida del estado de orden (fluidez) de las cadenas acilo (Brandenburg K. y col. (1997) *Biochim. Biophys Acta* 1.329:183-201). Las medidas se realizaron en un equipo Bruker IFS 55 (Bruker, Karlsruhe, Alemania) como se describió anteriormente (Brandenburg K. y col. (1997) *Biochim. Biophys Acta* 1.329:183-201). Para asegurar la homogeneidad, se prepararon suspensiones de LPS en HEPES 2,5 mM (pH 7,2) a
45 temperatura ambiente, se incubaron a 56 °C durante 15 min, se agitaron y se enfriaron a 4 °C. Esta etapa de calentamiento/enfriamiento se repitió tres veces, y las suspensiones se almacenaron a 4 °C durante varias horas antes del análisis. Las suspensiones de LPS (contenido de agua, 90 %) se analizaron en cubetas de CaF₂ con espaciadores de Teflón de 12,5 µm, y para cada medida, se acumularon 50 interferogramas, transformados de Fourier, y se convirtieron en espectros de absorbancia. Las medidas se obtuvieron en barridos de calentamiento continuos (2 °C/min) entre 10 °C y 60 °C. Para ensayar el efecto del complemento, los experimentos se realizaron en presencia de suero humano normal. Se valoró el efecto de la polimixina B de manera similar a diferentes relaciones molares de LPS:polimixina B (véase Resultados), y usando un PM promedio de 11800 para LPS de *B. abortus* (determinado por SDS-PAGE con *Yersinia enterocolitica* O:8 LPS como patrón).

50 **Manipulaciones de ADN.** Se extrajeron plásmido y ADN cromosómico con Qiaprep spin Miniprep (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), y kit de aislamiento de ADN Microbiano Ultraclean (Mo Bio Laboratories), respectivamente. Cuando fue necesario, el ADN se purificó de los geles de agarosa usando el kit de extracción de Gel Qiack (Qiagen). La secuenciación de ADN se realizó por el Servicio de Secuenciación de CIMA (Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona, España). Los cebadores (*primers*) estaban sintetizados por Sigma-Genosys Ltd. (Haverhill, Reino Unido). Las investigaciones de homologías de ADN y proteínas se llevaron a cabo usando el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el servidor del *EMBL-European Bioinformatics Institute* (http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html). Además, los datos de secuencia se obtuvieron de la página de internet de *The Institute for Genomic Research* en <http://www.tigr.org>. Las secuencias genómicas de *B. melitensis* 16M, *B. abortus* y *B. suis* se analizaron usando la base de datos del grupo bioinformático URBM (http://www.serine.urbm.fundp.ac.be/~seqbruce/GENOMES/Brucella_melitensis).

65

Construcción del mutante no polar de *lpcC* de *B. abortus* (*BABΔlpcC*). El mutante de delección estructural *BABΔlpcC* se construyó por PCR de superposición usando ADN genómico de *B. abortus* 2308 como plantilla de ADN. Los cebadores se diseñaron basándose en la secuencia disponible de los genes correspondientes en *B. abortus* 2308. Para la construcción del mutante de *lpcC*, primero generamos dos fragmentos de PCR: se usaron oligonucleótidos *lpcC*-F1 (5'-CTGGCGTCAGCAATCAGAG-3'; SEQ ID NO:17) y *lpcC*-R2 (5'-GTGCAACGACCTCAACTCC-3'; SEQ ID NO:18) para amplificar un fragmento de 476 pb que incluía los codones 1 a 16 del ORF de *lpcC*, así como 424 pb en dirección 5' (*upstream*) del codón de iniciación de *lpcC*, y oligonucleótidos *lpcC* -F3 (5'-GGAAGTTGAGGTCGTTGCACACGCCATCGAACCTTATCTG-3'; SEQ ID NO:19) y *lpcC* -R4 (5'-CGGCTATCGTGCGATTCT-3'; SEQ ID NO:20) se usaron para amplificar un fragmento de 453 pb que incluía los codones 308 a 354 del ORF de *lpcC* y 320 pb en dirección 3' (*downstream*) del codón de terminación de *lpcC*. Ambos fragmentos se ligaron por superposición PCR usando los oligonucleótidos *lpcC*-F1 y *lpcC*-R4 para la amplificación, y las regiones complementarias entre *lpcC*-R2 y *lpcC*-F3 para la superposición. El fragmento resultante, que contiene el alelo de delección de *lpcC*, se clonó dentro de pCR2.1 (Invitrogen), para generar el plásmido pRCI-23, se secuenció para asegurar el mantenimiento del marco de lectura, y posteriormente se subclonó en los sitios *Bam*HI y *Xba*I del plásmido suicida pJQK (Scupham A.J. y col. (1997) *Gene* 202:53-59). El plásmido mutador resultante (pRCI-26) se introdujo en *B. abortus* 2308 por conjugación. La primera recombinación (integración del vector suicida en el cromosoma) se seleccionó por resistencia a Nal y Kan, y la segunda recombinación (escisión del plásmido mutador que conduce a la construcción del mutante por intercambio alélico), se seleccionó por resistencia a Nal y sacarosa y sensibilidad a Kan. Las colonias resultantes se cribaron por PCR con cebadores *lpcC*-F1 y *lpcC*-R4 que amplificaban un fragmento de 929 pb en el mutante y un fragmento de 1805 pb en la cepa parental. La mutación generada da como resultado la pérdida del 82 % del ORF de *lpcC*, y la cepa mutante se llamó *BABΔlpcC*.

Complementación de *BABΔlpcC*. Tomando en cuenta que las secuencias de *LpcC* de *B. melitensis* y *B. abortus* son idénticas, los inventores usaron la ORFeoma de *B. melitensis* construida con la Tecnología de clonación Gateway (Invitrogen) para la complementación (Dricot A. y col. (2004) *Genome Res.* 14:2.201-2.206). Se extrajo el clon que lleva *lpcC* de *B. melitensis*, y el ADN que contenía el correspondiente ORF se subclonó en pRH001 (Hallez R. y col. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1.375-1.379) para producir plásmido *plpcC*. Para complementar la mutación de *lpcC*, se introdujo el plásmido *plpcC* en el mutante *BABΔlpcC* uniéndolo con S17-1 de *E. coli* y los conjugados que albergan *plpcC* (diseñados como *BABΔlpcCplpcC*) se seleccionaron colocando la mezcla de emparejamiento sobre placas TSA-Nal-kan que se incubaron a 37 °C durante 3 días.

Sensibilidad a brucellafagos, colorantes, anticuerpos y péptidos bactericidas policatiónicos. Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de polimixina B, poli-L-ornitina, poli-L-lisina, colistina, penicilina, doxiciclina, claritromicina, eritromicina, rifampicina, fucsina básica, safranina y tionina en medio Müller-Hinton por procedimientos estándar. Se midió la sensibilidad a brucellafagos específicos de S (Wb, lz) y rugoso (R/C) ensayando la lisis de las bacterias expuestas a diluciones en serie 1/10 hechas a partir de una solución madre de fago de dilución de ensayo de rutina (Alton G.G. y col. (1988) "Techniques for the brucellosis laboratory". Paris, Francia: INRA).

Sensibilidad a la acción bactericida de suero no inmune. Se ajustaron bacterias de crecimiento exponencial a 10⁴ UFC/ml en solución salina y se dispensaron por triplicado en placas de microtitulación (45 μl por pocillo) que contenían suero bovino normal fresco (90 μl/pocillo). Después de 90 min de incubación a 37 °C, se dispuso caldo de infusión de cerebro y corazón (200 μl/pocillo), se mezcló con la suspensión bacteriana y 100 μl se colocaron en placa sobre agar de soja triptico. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la UFC promedio con respecto al inóculo.

Multiplicación intracelular. Se aislaron células de médula ósea de fémures de hembras C57B1/6 de 7 a 8 semanas de edad de ratones TLR4^{-/-} (Hoshino K. y col. (1999) *J. Immunol.* 162: 3.749-3.752) o TLR9^{-/-} (Hemmi H. y col. (2000) *Nature* 408:740-745) y se diferenciaron dentro de o bien células dendríticas (BMDC) o macrófagos (BMDM) como se describe en Inaba y col. o De Chastellier y col. (Inaba K. y col. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1.693-1.702; Inaba K. y col. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1.693-1.702; De Chastellier C. y col. (1993) *Infect. Immun.* 61:3.775-3.784), respectivamente. Se realizaron infecciones centrifugando las bacterias sobre las células diferenciadas (400 x g durante 10 min a 4 °C; relación de bacterias:células de 20:1 para BMDC o 50:1 para BMDM) seguido de incubación a 37 °C durante o bien 15 min (BMDM) o 30 min (BMDC) bajo una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células o se lavaron exhaustivamente (BMDM) o se lavaron suavemente (BMDC) con medio para separar las bacterias extracelulares y se incubaron en medio suplementado con 100 μg/ml de gentamicina durante 1 hora para matar las bacterias extracelulares. A partir de entonces, se disminuyó la concentración de antibiótico a 20 μg/ml. Para hacer un seguimiento de la supervivencia intracelular de *Brucella*, las células infectadas se sometieron a lisis con Triton X-100 al 0,1 % (vol/vol) en H₂O (BMDC) o después de lavado con PBS (BMDM) y diluciones en serie de los lisados se colocaron rápidamente sobre placas de agar de soja triptico para enumerar las UFC.

Ensayos de inmunofluorescencia. Se dejaron crecer BMDC sobre cubreobjetos de cristal y se inocularon con bacterias como se describió anteriormente. A diferentes momentos después de la inoculación (véase Resultados), los cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 3 %, pH 7,4 a 37 °C durante 15 min y se lavaron tres veces con PBS. Los cubreobjetos se procesaron para tinción de inmunofluorescencia como se describió previamente (Celli J. y

col. (2003) *J. Exp. Med.* 198:545-556). En resumen, las células se permeabilizaron con saponina al 0,1 % y se incubaron con anticuerpos primarios. Después de varios lavados, los anticuerpos primarios se revelaron con los anticuerpos secundarios apropiados. Los anticuerpos primarios usados para el microscopio de inmunofluorescencia eran; anti-*B. abortus* de vaca; anti-LAMP1 ID4B de ratón de rata ("Developmental Studies Hybridoma Bank", *National Institute of Child Health and Human Development*, Universidad de Iowa); anti FK2 de ratón (Biomol) y Moab anti-calnexina (amablemente proporcionado por Dr. D. Williams, Universidad de Toronto). En todos los experimentos, las BMDc se marcaron usando un anticuerpo frente a un epítipo citoplasmático conservado encontrado en las subunidades MHC-II I-A B (Lelouard H. y col. (2002) *Nature* 417:177-182) que no produce marcación significativa con BMDc y también se marcaron con un anticuerpo anti-CD11c (Biolegend) que confirma que son DC (Salcedo S.P. y col. (2008) *PLoS Pathogens* 4: e21). Las muestras se analizaron bajo un microscopio de epifluorescencia Leica DMRBE para análisis cuantitativo, o un microscopio confocal de barrido por láser Zeiss LSM 510 para la adquisición de imagen.

Medición de Citoquina. Se usaron ensayos por inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA) (AbCys, París, Francia) para detectar IL-12 (p40/p70) y TNF α en los sobrenadantes de BMDc 24 horas después de la infección (véase anteriormente) o después de la estimulación con 10 μ g/ml del LPS apropiado de diferentes cepas de *Brucella* o 100 ng/ml de *E. coli* ATCC 35218 obtenida por el procedimiento de fenol-agua y se purificaron más por el método de fenol-agua-desoxicolato. Para el último fin, se preparó una solución madre de 1 mg/ml en agua estéril libre de pirógeno, se sometió a sonicación brevemente y se esterilizó mediante autoclave. Antes de usarse, la solución madre se calentó a 56 °C durante 15 min y, a continuación, se calentó a temperatura ambiente.

Unión de LPS a hMD-2 por ELISA competitivo. El ELISA para la determinación de la unión de LPS a hMD-2 se realizó en placas de 96 pocillos (inmunoplaqueta NUNC F96 cert. Maxi-sorp). Se usó anti-hMD2 de pollo (GenTel) (5 μ g/ml) en Na₂CO₃ 50 mM (pH 9,6) para cubrir la placa de microtitulación a 4 °C durante la noche. Los sitios de unión en exceso se bloquearon con BSA al 1 % en tampón PBS 10 mM (pH 7,2) durante 1 h a temperatura ambiente, y se aclaró tres veces con el mismo tampón. Durante la etapa de bloqueo, se preincubó hMD-2 (0,75 μ M) con LPS de 0 μ M a 8 μ M a 37 °C y, como control negativo, también se preincubó LPS en ausencia de hMD2. Estas soluciones preincubadas se añadieron a la placa, la cual, a continuación, se incubó durante 1 h a 37 °C. Después de aclarar, se detectó la hMD2 no unida a LPS mediante incubación con 0,1 μ g/ml de anti h-MD2 de ratón (clon 9B4 e-Bioscience) en tampón PBS 10 mM a 37 °C durante 1 h, seguido de incubación con 0,1 μ g/ml de anti-IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Santa Cruz), también en tampón PBS a 37 °C durante 1 h. Después de lavar la placa, se añadió ABTS (Sigma), la reacción se paró con SDS al 1 % después de 15 min, y la absorbancia a 420 nm se midió usando un equipo Mithras LB940. (Berthold Technologies).

Ensayo de Virulencia en ratones. Se realizaron experimentos de infección como se describe en Conde-Alvarez, R. y col., 2006, *Cell. Microbiol.* 8:1.322-1.335. Para cada cepa, se inocularon 30 ratones de forma intraperitoneal con 0,1 ml de inóculo que contenía 5,8 x 10⁴ (control parental) y 4,9 x 10⁴ (*BAB Δ lpcC*) se determinaron la UFC/ratón y el número de UFC en bazo (n=5) a 1, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas después de la inoculación. La identidad de los aislados de bazo se confirmó por PCR en varios puntos durante el proceso de infección. Los datos individuales se normalizaron mediante transformación logarítmica, y se calcularon la media y la desviación estándar del log UFC/bazo. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el ensayo de Diferencias Mínimas Significativas Protegidas de Fisher. Una infección adicional se realizó bajo las mismas condiciones pero incluyendo *BAB Δ lpcC* que alberga *lpcC*. El número de UFC en bazo se determinó 8 semanas después de la inoculación.

Estudios de protección en ratones. Se inocularon tres grupos de 10 ratones cada uno de forma subcutánea con 3,9 x 10⁴ UFC de *BAB Δ lpcC*, 1,3 x 10⁵ de *B. abortus* S19 por ratón, o solución salina como control. Cuatro semanas después de la vacunación, cada grupo se expuso a infección intraperitoneal de 3,6 x 10⁴ UFC de *B. abortus* virulenta por ratón. Para diferenciar la exposición de la cepa de vacuna, se usó GFP de *BAB-parental* (Tabla 1) tomando ventaja de su resistencia a kanamicina (en experimentos preliminares, la virulencia de GFP de *BAB-parental* se midió y se encontró que era idéntica al de *BAB-parental*). Dos y seis semanas después, los ratones se sometieron a eutanasia por dislocación cervical, y se determinó la UFC de la cepa de exposición en los bazo sobre agar de soja tríptico suplementado con kanamicina (véase anteriormente). Se calculó la media \pm SD del log UFC por bazo y se realizaron las comparaciones estadísticas como se describió anteriormente. Las dosis de vacuna y exposición, vías e intervalos de exposición se eligieron sobre la base de la evidencia previa (Grillo M.J. y col. (2000) *Biologicals* 28:119-127; Stevens M.G. y col. (1995) *Infection and Immunity* 63:264-270).

RESULTADOS

Construcción y características de un mutante de *lpcC* de *B. abortus*. Para analizar el papel del ORF BAB1_1522 en la síntesis de LPS de *Brucella*, los inventores construyeron un mutante no polar (*BAB Δ lpcC*) haciendo una deleción interna estructural de la región codificadora de los aminoácidos 17 a 307. Para ensayar si la mutación inducía modificaciones o cambios del desarrollo celular en el patrón de permeabilidad característico de *Brucella* (Martínez de Tejada G. y col, (1993) *J. Bacteriol* 175:5.273-5.275), los inventores compararon la sensibilidad de la cepa *BAB-parental* y el mutante *BAB Δ lpcC* a brucellafagos S y R, colorantes (fucsina, tionina y safranina) y anticuerpos hidrófobos (eritromicina, rifampicina) e hidrófilos (penicilina, doxiciclina, claritromicina). Ambas cepas se comportaron de manera similar en todos los ensayos realizados y, además, mostraron tasas de

crecimiento similares (datos no mostrados).

El mutante *BABΔlpcC* tiene un defecto en el núcleo de LPS. Para analizar el efecto de la mutación de *lpcC* en la estructura de LPS, los inventores extrajeron esta molécula usando el protocolo desarrollado para S-LPS S de *Brucella* (Leong D. y col. (1970) *Infection and Immunity* 1:174-182). Este protocolo incluye una división con fenol-agua seguido de la primera digestión con nucleasas y proteinasa K y después ultracentrifugación, una etapa que permite la recuperación de por encima del 70 % del LPS purificado en el sedimento. A continuación, el LPS se libera de los fosfolípidos y lípidos de ornitina mediante extracción por disolvente. Sin embargo, cuando este método se aplicó a *BABΔlpcC*, el rendimiento era solamente un 32 % del obtenido con la cepa parenteral, un resultado que podría ser debido a o bien una cantidad disminuida de LPS en *BABΔlpcC*, o a un fallo del protocolo estándar para producir el LPS cuantitativamente. La primera posibilidad se descartó mediante la medición del contenido total de LPS bacteriano usando el método de extracción con SDS-proteinasa k seguido de transferencia tipo Western con Moab anti-cadena O Cby-33H8 (especificidad C/Y) (Fig. 1). Cuando los inventores volvieron a examinar el protocolo clásico, encontraron que el sobrenadante de la ultracentrifugación contenía una cantidad inesperada de un material. Por el análisis de SDS-PAGE y Kdo este material era similar al S-LPS obtenido en cantidades menores en el sedimento de la etapa de ultracentrifugación (no mostrado). Estos resultados sugirieron un estado de agregación diferente en los S-LPS parentales y de *BABΔlpcC*, una posibilidad ensayada midiendo el tamaño agregado por dispersión dinámica de la luz. Tanto para los S-LPS parentales como de *BABΔlpcC*, los agregados en las fracciones del sobrenadante tenían una relación promedio de aproximadamente 100 nm mientras que aquellos en el sedimento eran de aproximadamente 150 nm a concentraciones por encima de 100 μg/ml (Fig. 2). Esto, sin embargo, no se relacionó con una diferencia en la concentración de agregado crítico de estos LPS (10 μg/ml), mostrada por fluorimetría (Fig. 2). Estos resultados mostraron que las fracciones mayores del LPS de *BABΔlpcC* y *BAB-parental* diferían en el tamaño del agregado.

La SDS-PAGE y el análisis de transferencia tipo Western mostraron que, como se esperaba, la cepa parenteral contenía un LPS de tipo natural que consistía en tanto fracciones S como R (Fig. 1). Sin embargo, aunque no hay cambio en el contenido de S-LPS total, los extractos de LPS de *BABΔlpcC* tenían menos cantidades de R-LPS y con una diferente forma de patrón de migración. Esta peculiaridad, la cual se observó tanto en las fracciones de sobrenadante (no mostrado) como de sedimento (Fig. 1), se corroboró por la falta de reactividad de los Moabs anti-núcleo (Fig. 1) con LPS obtenido de *BABΔlpcC* por el procedimiento de SDS-proteinasa K. Además, cuando se introdujo el plásmido *pLpcC* (que codifica el gen *lpcC*) en *BABΔlpcC*, se restauró la reactividad del Moab (Fig. 1). Estos resultados indican que se requiere *LpcC* para la síntesis normal del LPS central pero no para el ensamblaje e incorporación de la cadena O. A menos que se indique lo contrario, los estudios descritos más adelante se realizaron con las fracciones mayores de cada bacteria (a partir de ahora referidas como Ba wt-LPS y Ba *LpcC*-LPS).

Se requiere un núcleo de LPS intacto para la resistencia de *B. abortus* a la acción bactericida de péptidos policatiónicos y suero normal. Las brucellas S son resistente a la acción bactericida del suero normal, y esta resistencia se ha atribuido a la cadena O (Eisenschenk F.C. y col. (1999) *Vet. Microbiol.* 68:235-244). Sin embargo, se ha informado que algunos mutantes R de *B. melitensis* y *B. ovis* (una especie de *Brucella* naturalmente R) son resistentes al suero (David González, Caro-Hernández, Fernández-Prada), sugiriendo que el núcleo de LPS también puede ser importante. Para valorar esta posibilidad, se incubaron *BABΔlpcC*, *BABTn::5per*, *BABTn::5bvrr* (Tabla 1) y *BAB-parental* en suero normal durante 90 minutos y se ensayó su viabilidad. Tal como se puede ver en la Fig. 3, *BABΔlpcC* era más sensible que la cepa *BAB-parenteral* pero no tanto como los mutantes *bvrr*. Además, la comparación con *BABTn::5 per* mostró que el núcleo era tan importante como la cadena O en su propiedad.

Se ensayó la implicación del defecto en Ba *LpcC*-LPS en la sensibilidad a suero incrementada de *BABΔlpcC*. Para este fin, los inventores examinaron la fluidez de la cadena acilo del lípido A de Ba wt-LPS y Ba *LpcC*-LPS en presencia de suero, puesto que este parámetro aumenta tras la unión de las moléculas a los agregados de LPS (Brandenburg K. y col. (2005) *Biophys. J.* 88:1.845-1.858). Tal como se muestra en la Fig. 3, la transición $\beta \leftrightarrow \alpha$ que marca el cambio desde la fase cristalina a la fluida tiene lugar en el intervalo de 30 a 40 °C para Ba wt-LPS, con una Tc de 37 °C en ausencia de suero. Sorprendentemente, Ba *LpcC*-LPS mostró un perfil de fluidez muy diferente con una Tc entre 45 y 55 °C, y con una fluidez de cadena acilo más restringida por debajo de la Tc que Ba wt-LPS, que muestra que los agregados estaban en la fase cristalina a temperaturas fisiológicas. A pesar de esta mayor rigidez, los agregados de Ba *LpcC*-LPS estaban claramente afectados por la presencia de suero normal mientras que aquellos de Ba wt-LPS no lo estaban (Fig. 3). Estos resultados sugieren que la falta de parte del núcleo podría ser el descubrimiento de dianas complementarias y concuerdan con la sensibilidad a suero de las bacterias.

Brucella también es resistente a péptidos policatiónicos bactericidas (Martínez de Tejada G. y col. (1995) *Infect Immun* 63:3.054-3.061; Freer E. y col. (1996) *J. Bacteriol.* 178:5.867-5.876), una propiedad ligada en su mayoría a la carga negativa baja en las secciones de LPS del núcleo y el lípido A (Velasco J. y col. (2000) *Infect Immun* 68:3.210-3.218). Para valorar si el defecto de núcleo en *BABΔlpcC* afectaba esta propiedad, los inventores examinaron la sensibilidad a polimixina B, colistina, poli-L-lisina y poli-L-ornitina. Los resultados demostraron una mayor sensibilidad de *BABΔlpcC* a todos estos agentes (Fig. 4). Como en los experimentos de sensibilidad a suero, se ensayó Ba *LpcC*-LPS para la unión de policatiación midiendo la fluidez de la cadena de acilo. La Fig. 4 muestra que la polimixina B incrementaba la fluidez de Ba *LpcC*-LPS.

Se requiere un núcleo de LPS intacto para que *B. abortus* evite la fusión a lisosoma y se multiplique en células dendríticas. Se ensayó la capacidad de *BABΔpcC* de multiplicarse en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) y células dendríticas (BMDC) en comparación con *BAB-parenteral*. El comportamiento en BMDM de ambas bacterias era similar, mostrando así no atenuación del mutante en estas células (Fig. 5). Por el contrario, el mutante *virB* atenuado usado como control no logró multiplicarse. En BMDC, sin embargo, *BABΔpcC* y *BAB-parenteral* mostraron un comportamiento diferente. Mientras que *BAB-parenteral* no se destruía y era capaz de multiplicarse, *BABΔpcC* disminuía notablemente o bien inmediatamente después de la infección (Fig. 5A) o después de 24 horas (no mostrado), dependiendo del experimento, aunque no hasta el punto del *virB* control. La complementación de *BABΔpcC* con plásmido *pLpcC* restauró la capacidad de multiplicarse en estas células.

La localización intracelular en BMDC se determinó por microscopía confocal (Fig. 5B). Veinticuatro horas después de la infección, se presentó *BAB-parenteral* en alto número en BMDC mientras que las células infectadas con *BABΔpcC* casi estaban libres de ellas. Además, la mayoría de las bacterias *BAB-parenteral* se localizaban conjuntamente con el marcador del retículo endoplasmático calnexina, pero no con el marcador lisosomal LAMP-1. Por el contrario, el mutante *BABΔpcC* estaba en vacuolas LAMP1-positivas, aparentemente incapaces de establecer un compartimento derivado del retículo endoplasmático. Tomados en conjunto, estos resultados indican que una mayor proporción de las bacterias mutantes se degradó pronto después de la absorción, mostrando que el núcleo de LPS tiene un papel en la resistencia de *B. abortus* a ser matada por las células dendríticas.

La deficiencia del núcleo de LPS incrementa la secreción de TNF α y IL12 por células dendríticas infectadas con *B. abortus*. La infección por *Brucella* se caracteriza por una baja inducción de mediadores proinflamatorios e inflamatorios, incluyendo TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10 y IL-12, y LPS es una molécula clave en este bajo reconocimiento mediante inmunidad innata (Barquero-Calvo E. y col. (2007) *PLoS ONE* 2: e631). Por lo tanto, era de interés estudiar la producción de TNF α y IL-12 por BMDC infectadas con *BAB-parenteral* y con *BABΔpcC* y ver si los resultados se reproducían por estimulación con los LPS. Los resultados mostraron que el mutante inducía una producción más fuerte de ambas citoquinas que era comparable a la capacidad de Ba LpcC-LPS a estimular la secreción de ambas citoquinas (Fig. 6). Además, los experimentos en BMDC obtenidos de los mutantes TLR apropiados demostraron que los efectos eran dependientes de TLR4 y, por lo tanto, directamente atribuibles al LPS (Fig. 6). Además, los inventores observaron que la fracción de LPS menor en los sobrenadantes de los extractos de *BAB-parenteral* producían resultados similares a los obtenidos con Ba wt-LPS, pero la fracción de sedimento que correspondía a Ba LpcC-LPS no lograba estimular altas cantidades de cualquiera de las dos citoquinas (no mostrado).

El núcleo de LPS de *B. abortus* modula el reconocimiento por MD2. Las bacterias que llevan un LPS clásico se reconocen por el sistema CD-14-MD2 TLR4 que desencadena una cascada de señales que conducen a la producción de citoquina. En este reconocimiento, MD2 juega un papel crítico y hay evidencia de que interactúa con LPS clásico a través la sección del núcleo y del lípido A (Gruber A. y col. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:28.475-28.482; Ohto U. y col. (2007) *Science* 316:1.632-1.634). Sin embargo, se sabe que las mutaciones TLR4 no afectan al trascurso de las infecciones por *Brucella* (Barquero-Calvo E. y col. (2007) *PLoS ONE* 2: e631; Lapaque N. y col. (2006) *Cellular Microbiology* 8:401-413) y que el LPS de *Brucella* activa débilmente el sistema TLR4-MD2 (Duenas Al. y col. (2004) *Int. Immunol* 16:1.467-1.475). Puesto que *BABΔpcC* indujo anómalamente altos niveles de citoquinas en comparación con *BAB-parenteral*, era de interés estudiar la interacción de Ba LpcC-LPS con MD2. Para este fin, se usó un ELISA competitivo con hMD2 y un anticuerpo de reconocimiento libre de hMD2 pero no a hMD2 unida a LPS (Gradisar H. y col. (2007) *J. Leukoc. Biol.* 82: 968-974; Gradisar H. y col. (2007) *J. Leukoc. Biol.* 82:968-974). De acuerdo con la inducción baja de citoquina *in vivo*, Ba wt-LPS no inhibió el anticuerpo que se unía a hMD2 en cualquiera de las concentraciones ensayadas. Por el contrario, Ba LpcC-LPS inhibió la unión a 40 μ g/ml o mayores concentraciones, un valor que, aunque claramente diferente del de LPS de *S. enteritidis*, se aparta del de Ba wt-LPS (Fig. 7). En este caso, las fracciones menores de los extractos de LPS de tanto *BAB-parenteral* como *BABΔpcC* reprodujeron estos resultados, aunque no tan patentemente para el último. Estos resultados demuestran que el núcleo de LPS de *B. abortus* contribuye al bajo reconocimiento de LPS de *Brucella* por MD2.

La inhibición de la maduración de la célula dendrítica por *B. abortus* requiere un núcleo de LPS intacto. En respuesta a los productos microbianos, las células dendríticas experimentan un proceso de maduración que incluye la formación de agregados de proteína poliubiquitinada grandes, denominados estructuras inducidas similares a agresoma de célula dendrítica (DALIS). Las DALIS se cree que contienen proteínas mal plegadas y componentes del sistema de ubiquitina, sugiriendo que la ubiquitinación de las proteínas mal plegadas se da en estas estructuras. Se ha sugerido que el almacenamiento de auto proteínas mal plegadas durante la infección puede permitir presentación eficaz de péptidos a partir de proteínas microbianas extrañas.

Brucella interfiere con la maduración de células dendríticas, una capacidad que debería favorecer el establecimiento de la infección (Salcedo S.P. y col. (2008) *PLoS Pathogens* 4: e21). Par analizar si la atenuación de *BABΔpcC* en BMDC estaba acompañada de un defecto en esta interferencia, se examinó la formación de DALIS usando un Moab FK2 que reconoce las proteínas ubiquitinadas (Fujimuro M. (1994) *FEBS Lett* 349:173-180). Tal como se ve en la Fig. 8, el mutante *BABΔpcC* inducía un mayor número de DALIS que la cepa parental. Para relacionar este efecto con la estructura de Ba LpcC-LPS, los inventores estimularon BMDC obtenida de, ratones ko de tipo natural TLR4 o TLR9 (como control) (datos no mostrados). Para Ba wt-LPS, no se observaron DALIS en ningún tipo de células

dendríticas. Por el contrario, Ba LpcC-LPS indujo la formación de DALIS en células TLR9 ko pero no en TLR4 ko, demostrando de ese modo la implicación de Ba LpcC-LPS en la inducción de la maduración de la célula dendrítica.

Se requiere un núcleo de LPS intacto para la virulencia de *B. abortus* en ratones. *BABΔlpcC* era incapaz de multiplicarse en BMDC, sugiriendo que este mutante se podría atenuar en el modelo de ratón. Para probar esta hipótesis, se infectaron ratones BALBc de forma intraperitoneal con *BAB-parenteral* y *BABΔlpcC* y se compararon las cinéticas de multiplicación bacteriana en el bazo y los pesos del bazo (Fig. 6). *BABΔlpcC* mostró atenuación significativa ($P=0,0002$) a partir de la 4^o semana en adelante. A la 6^o semana, la UFC/bazo de *BAB-parenteral* era 2 log mayor, y esta diferencia no cambió en momentos posteriores. La esplenomegalia no se incrementó de manera similar para ambas bacterias hasta la 4^o semana. Sin embargo, mientras que el aumento del bazo alcanzaba un máximo en la semana 8 para *BAB-parenteral*, comenzaba a descender después de la semana 4 para el *BABΔlpcC*. En un experimento independiente la UFC de bazo de la cepa complementada *BABΔlpcC-plpcC* y la cepa *BAB-parenteral* (media y desviación estándar de log UFC 6,74±0,25 y 6,35±0,31, respectivamente) no eran significativamente diferentes ($P=0,15$) en el momento ensayado (8^o semana). Además, ambas eran significativamente diferentes de la UFC obtenida para *BABΔlpcC* en este experimento (4,04±0,49; $P<0,001$). Estos resultados claramente indicaron que se requiere un núcleo de LPS intacto para virulencia completa de *B. abortus* en ratones.

Protección en ratones. La infección en BMDC desencadenó una fuerte respuesta de IL12 que es anómala en brucelosis de ratón y podría dar como resultado una respuesta de Th1 protectora. Esta posibilidad era coherente con la esplenomegalia observada debido a que el aumento del bazo se correlaciona con los niveles de IFN-γ y IL12 en brucelosis de ratón (Zhan Y. y col. (1993) *Infection and Immunity* 61:4.899-4.901; Zhan Y. y col. (1995) *Infection and Immunity* 63:1.387-1.390) y ambas citoquinas son decisivas en la generación de una inmunorespuesta eficaz a *Brucella* (Baldwin C.L. y col. (2002) *Vet. Microbiol.* 90:367-382). Interesantemente, aunque los animales inoculados con *BABΔlpcC* finalmente aclararán la infección (Fig. 11), la esplenomegalia producida por *BABΔlpcC* no solamente era mayor que la generada por el mutante *BABTn5::per* sino también consistentemente mayor que la inducida por la vacuna de referencia *B. abortus* S19 (Fig. 9). Por estas razones, los inventores valoraron la protección frente a *B. abortus* virulento inducido por la vacunación con *BABΔlpcC*. Tal como se muestra en la Tabla 2, cuando se examinaron los bazos 2 semanas después de la exposición, los animales vacunados con *BABΔlpcC* contenían significativamente menor número de UFC/bazo de la cepa de exposición que el control de solución salina ($P<0,001$). Además, el número de UFC/bazo de la cepa de exposición también era significativamente menor ($P=0,025$) en ratones vacunados con *BABΔlpcC* que en los vacunados con S19. Las diferencias entre ratones vacunados con *BABΔlpcC* y solución salina se aumentó seis semanas después de la exposición, y en este momento, la inmunidad proporcionada por la vacunación con S19 había decaído completamente (Tabla 2)

Tabla 2. Protección frente a infección con *B. abortus* en BALB/c proporcionada por vacunación con *BABΔlpcC* o *B. abortus* S19

Vacuna	X log ₁₀ UFC en bazo ± SD de <i>B. abortus</i> virulento a semana después de exposición	
	2	6
<i>BABΔlpcC</i>	1,25 ± 0,7 ^{a, b}	0,81 ± 0,25 ^{a, c}
S19	3,47 ± 1,06 ^b	5,27 ± 0,35 ^d
Solución salina	5,42 ± 0,51	5,49 ± 0,12

^a P frente a solución salina <0,001.

^b P frente a S19 <0,05.

^c P frente a S19 <0,001.

^d P frente a solución salina >0,05 (no significativo).

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

<120> BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS MODIFICADAS PARA SU USO COMO VACUNAS

45

<130> BEP090056

<160> 28

50

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 354

<212> PRT

55

<213> *Brucella abortus*

ES 2 612 486 T3

<400> 1

Met Thr Leu Ser Gly Gln Val Pro Val Arg Glu Val Glu Val Val Ala
 1 5 10 15

Pro Asn Phe Lys Arg Arg Leu Ser Gly Val Thr Ser Thr Ile Val Gln
 20 25 30

Leu Ile Pro Leu Gln Arg Ala Met Gly Leu Lys Ile Ala Thr Met Gly
 35 40 45

Pro Gly Leu Pro Asp Thr Leu Pro His Leu Gly Trp Ser Ala Leu Pro
 50 55 60

Ser Phe Trp Ser Arg Pro Lys Thr Arg Arg Phe Arg Ile Trp His Ala
 65 70 75 80

Arg Arg Asn Ile Glu Met Leu Ala Gly Ile Phe Met Arg Asp Val Leu
 85 90 95

Arg Met Lys Leu Arg Leu Val Phe Thr Ser Ala Ala Gln Arg His His
 100 105 110

Lys Pro Phe Thr Lys Trp Leu Ile Arg Arg Met Asn Ala Val Ile Ala
 115 120 125

Thr Ser Val Arg Ser Gly Ser Phe Leu Glu Val Pro His Gln Val Ile
 130 135 140

Met His Gly Val Asp Leu Glu Arg Phe His Pro Pro Leu Ala Glu Asp
 145 150 155 160

Asp Asp Phe Ser Ala Ser Gly Leu Pro Gly Lys Tyr Ala Val Gly Cys
 165 170 175

Phe Gly Arg Val Arg Pro Ser Lys Gly Thr Asp Leu Phe Val Asp Ala
 180 185 190

Met Ile Ala Leu Leu Pro Lys Tyr Pro Asp Trp Thr Ala Ile Val Thr
 195 200 205

Gly Arg Thr Thr Ala Glu Tyr Gln Ala Phe Glu Ala Glu Leu Arg Thr
 210 215 220

Arg Ile Ala Ala Ala Gly Leu Gln Asp Arg Ile Leu Ile Leu Gly Glu
 225 230 235 240

Val Pro Asp Val Arg Val Trp Tyr Arg Arg Leu Thr Leu Tyr Val Ala
 245 250 255

Pro Ser Arg Asn Glu Gly Phe Gly Leu Thr Pro Leu Glu Ala Met Ala
 260 265 270

Ser Lys Thr Ala Val Val Ala Ser Asp Ala Gly Ala Tyr Ala Glu Met
 275 280 285

Val Val Glu Asp Thr Gly Arg Phe Val Pro Ala Gly Asp Gly Arg Ala
 290 295 300

Leu Thr Asn Ala Ile Glu Pro Tyr Leu Ala Asp Pro Ala Met Thr Lys
 305 310 315 320

Arg Cys Gly Glu Asn Ala Leu Ala His Val Arg Glu Ala Phe Pro Leu
 325 330 335

Gln Lys Glu Ala Ala Ala Ile Ser Ser Val Tyr Glu Gln Val Phe Ala
 340 345 350

Gly Arg

- <210> 2
- <211> 352
- <212> PRT
- <213> *Bartonella quintana*

5

<400> 2

Met Arg Met Ser Leu Lys Glu Thr Glu Val Ile Ala Pro His Phe Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Leu Ser Gly Val Thr Ser Thr Val Ile Gln Leu Ile Pro Leu
 20 25 30

Gln Arg Lys Gln Gly Ile His Ile Ser Thr Leu Gly Phe Gly Leu Pro
 35 40 45

10

ES 2 612 486 T3

Lys Asn Leu Pro Ala Leu Ala Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Trp Lys
 50 55 60

Ser Pro Val Asp Lys Pro Phe Arg Ile Trp His Ala Arg Arg Asn Ile
 65 70 75 80

Glu Met Leu Cys Gly Val Phe Leu Arg Asp Ile Leu Arg Met Lys Leu
 85 90 95

Lys Leu Leu Phe Thr Ser Ala Ser Arg Arg His His Lys Pro Phe Thr
 100 105 110

Lys Trp Leu Ile Arg Arg Met Asp Lys Val Ile Ala Thr Ser Val Cys
 115 120 125

Thr Gly Thr Tyr Leu Glu Val Pro His Gln Val Val Met His Gly Val
 130 135 140

Asp Val Arg Arg Phe Ser Pro Pro Lys Thr Leu Asp Asp Cys Phe Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Phe Pro Gly Lys Tyr Ala Val Gly Cys Phe Gly Arg Val
 165 170 175

Arg Tyr Leu Lys Gly Thr Asp Leu Phe Val Asn Ala Met Ile Ala Leu
 180 185 190

Leu Pro Arg Tyr Pro Glu Trp Thr Ala Leu Ile Ala Gly Arg Thr Thr
 195 200 205

Glu Gln His Tyr Asn Phe Glu Lys Lys Leu Arg Gln Lys Ile Ala Glu
 210 215 220

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

Pro Leu Trp Tyr Arg Arg Leu Ser Leu Tyr Val Thr Pro Ser Arg Leu
 245 250 255

Glu Gly Phe Gly Leu Thr Pro Leu Glu Ala Met Ala Ser Gln Thr Ala
 260 265 270

Val Val Thr Ser Asp Val Gly Ile Phe Lys Glu Leu Val Val Glu Gly
 275 280 285

Thr Gly Thr Val Val Gln Ala Gly Asp Gly Val Ala Leu Thr Glu Ala
 290 295 300

Ile Glu Pro Tyr Phe Ala Asp Leu Glu Lys Thr Leu Val Ala Gly Glu

ES 2 612 486 T3

305					310					315				320	
Lys	Ala	Leu	Ala	His	Val	Arg	Thr	His	Phe	Pro	Leu	Glu	Lys	Glu	Ala
				325					330					335	
Ala	Glu	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Glu	Thr	Met	Phe	Ser	Glu	Lys	Thr	Leu
			340					345					350		

<210> 3

<211> 352

5 <212> PRT

<213> *Bartonella tribocorum*

<400> 3

ES 2 612 486 T3

Met Arg Val Ser Leu Glu Glu Thr Glu Ile Ile Ala Pro His Phe Lys
 1 5 10 15

Arg Pro Leu Ser Gly Glu Thr Ser Thr Ile Val Gln Leu Val Pro Leu
 20 25 30

Met Arg Glu Gln Gly Val Arg Ile Ser Thr Leu Gly Val Gly Leu Pro
 35 40 45

Lys Lys Met Pro Ala Leu Ala Phe Arg Asp Leu Phe Gly Leu Trp Lys
 50 55 60

Ser Pro Lys Gly Lys Ser Phe Arg Ile Trp His Ala Arg Arg Asn Ile
 65 70 75 80

Glu Met Leu Cys Gly Ile Phe Leu Arg Asp Ile Leu Lys Met Lys Leu
 85 90 95

Lys Leu Ile Phe Thr Ser Ala Ser Gln Arg His His Lys Pro Phe Thr
 100 105 110

Lys Trp Leu Ile Arg Arg Met Asp Arg Val Ile Ala Thr Ser Thr His
 115 120 125

Thr Gly Ala Tyr Leu Glu Val Pro His Lys Val Ile Met His Gly Val
 130 135 140

Asp Val Arg Arg Phe Thr Pro Pro Gln Thr His Asp Asp Cys Phe Ala
 145 150 155 160

Ser Thr Gly Phe Pro Gly Lys Tyr Ala Val Gly Cys Phe Gly Arg Val
 165 170 175

Arg Tyr Leu Lys Gly Thr Asp Leu Phe Val Glu Ala Met Ile Ala Leu
 180 185 190

ES 2 612 486 T3

Leu Pro His Tyr Pro Glu Trp Thr Ala Leu Ile Ala Gly Arg Thr Thr
 195 200 205

Glu Gln His Tyr His Phe Glu Lys Glu Leu Arg Gln Lys Ile Ala Lys
 210 215 220

Ala Gly Leu Asp Asp Arg Ile Ile Phe Leu Gly Glu Ile Leu Asp Ile
 225 230 235 240

Pro Leu Trp Tyr Arg Arg Leu Ser Leu Tyr Val Thr Pro Ser Arg Leu
 245 250 255

Glu Gly Phe Gly Leu Thr Pro Leu Glu Ala Met Ala Ser Gln Val Ala
 260 265 270

Val Val Thr Ser Asp Val Gly Ile Phe Lys Glu Leu Val Val Glu Gly
 275 280 285

Thr Gly Thr Val Val Lys Val Gly Asp Gly Ser Ala Leu Thr Ala Ala
 290 295 300

Ile Glu Pro Tyr Phe Ala Asp Val Glu Lys Thr Leu Ala Ala Gly Lys
 305 310 315 320

Lys Ala Leu Thr His Val Arg Thr His Phe Pro Leu Glu Lys Glu Ala
 325 330 335

Asn Glu Ile Glu Ser Val Tyr Lys Glu Leu Phe Ala Glu Lys Ile Pro
 340 345 350

<210> 4
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> *Bartonella bacilliformis*

5

<400> 4

ES 2 612 486 T3

Met His Val Ser Leu Lys Glu Thr Asp Ile Ile Val Pro His Phe Lys
1 5 10 15

Lys Arg Leu Ser Gly Ile Lys Ser Thr Val Ile Gln Leu Ile Pro Leu
 20 25 30

Gln Arg Lys Gln Gly Ile Arg Ile Ser Ser Phe Gly Val Gly Leu Pro
 35 40 45

Lys Asn Leu Pro Thr Leu Arg Val Arg Asp Ile Phe Gly Leu Trp Lys
 50 55 60

Ser Pro Ala Gly Lys Ser Phe Arg Val Trp His Ala Arg Arg Asn Ile

Ala Glu Ile Gly Ala Val Tyr Glu Lys Ile Phe Ala Ala Lys Met Phe
 340 345 350

<210> 5
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Ochrobactrum anthropi*

5

<400> 5

Met Ala Pro Asn Phe Lys Arg Arg Leu Ser Gly Val Thr Ser Thr Ile
 1 5 10 15

Val Gln Leu Ile Pro Leu Gln Arg Ala Lys Gly Leu Asn Ile Ala Thr
 20 25 30

Met Gly Pro Gly Leu Pro Asp Thr Leu Pro His Leu Gly Arg Ser Ala
 35 40 45

Leu Trp Ser Phe Trp Ser Lys Pro Ala Thr Lys Pro Phe Arg Ile Trp
 50 55 60

His Ala Arg Arg Asn Ile Glu Met Leu Ala Gly Ile Phe Met Arg Asp
 65 70 75 80

Val Leu Arg Met Lys Leu Arg Leu Ile Phe Thr Ser Ala Ala Gln Arg
 85 90 95

Asp His Lys Pro Phe Thr Lys Trp Leu Ile Arg Arg Met Asn Ala Val
 100 105 110

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

Val Ile Met His Gly Val Asp Leu Glu Arg Phe His Pro Pro Val Gly
 130 135 140

Asp Glu Asp Ser Phe Ala Ala Ser Gly Leu Pro Gly Lys Tyr Ala Val
 145 150 155 160

Gly Cys Phe Gly Arg Val Arg Ser Ser Lys Gly Thr Asp Leu Phe Val
 165 170 175

Asp Ala Met Ile Ala Leu Leu Pro Gln Tyr Pro Asp Trp Thr Ala Ile
 180 185 190

Ile Thr Gly Arg Thr Thr Ala Glu His Gln Ser Phe Glu Asp Ala Leu
 195 200 205

10

ES 2 612 486 T3

Lys Ala Lys Ile Ala Ala Ala Gly Leu Gln Asp Arg Ile Leu Ile Leu
 210 215 220

Gly Glu Val Pro Asp Ile Arg Val Trp Tyr Arg Arg Leu Thr Leu Tyr
 225 230 235 240

Val Ala Pro Ser Arg Asn Glu Gly Phe Gly Leu Thr Pro Leu Glu Ala
 245 250 255

Met Ala Ser Gln Thr Ala Val Val Ala Ser Asp Ala Gly Ala Tyr Ala
 260 265 270

Glu Met Ile Val Glu Gly Thr Gly Thr Ser Val Ala Ala Gly Asp Gly
 275 280 285

Asp Ala Leu Arg Lys Ala Ile Glu Pro Tyr Leu Ala Asp Pro Ala Leu
 290 295 300

Ala Glu Arg Asp Gly Glu Asn Ala Leu Arg His Val Arg Ala Thr Phe
 305 310 315 320

Pro Leu Glu Lys Glu Ala Ala Ala Ile Ser Ala Val Tyr Glu Arg Val
 325 330 335

Phe Ala Gly Lys
 340

- <210> 6
- <211> 350
- <212> PRT
- <213> *Ochrobactrum intermedium*
- <400> 6

5

ES 2 612 486 T3

Met Lys Val Arg Val Gln Asp Val Glu Val Val Ala Pro Asn Phe Lys
1 5 10 15

Arg Arg Leu Ser Gly Val Thr Ser Thr Ile Val Gln Leu Ile Pro Leu
 20 25 30

Gln Arg Ala Lys Gly Leu Asn Ile Ala Thr Met Gly Pro Gly Leu Pro
 35 40 45

Asp Thr Leu Pro His Leu Gly Trp Gly Ala Leu Leu Ser Phe Trp Ser
 50 55 60

Lys Pro Arg Thr Lys Pro Phe Arg Ile Trp His Ala Arg Arg Asn Ile
65 70 75 80

Glu Met Leu Ala Gly Ile Phe Met Arg Asp Val Leu Arg Met Lys Leu
 85 90 95

ES 2 612 486 T3

Arg Leu Ile Phe Thr Ser Ala Ala Gln Arg Asp His Lys Pro Phe Thr
 100 105 110

Lys Trp Leu Ile Arg Arg Met Asn Ala Val Ile Ala Thr Ser Gly Arg
 115 120 125

Ser Gly Ser Phe Leu Gln Val Pro His Asp Val Ile Met His Gly Val
 130 135 140

Asp Leu Gln Arg Phe His Pro Pro Val Gly Asp Asp Asp Ser Phe Ala
 145 150 155 160

Ala Ser Gly Leu Pro Gly Lys Tyr Ala Val Gly Cys Phe Gly Arg Val
 165 170 175

Arg Ser Ser Lys Gly Thr Asp Leu Phe Val Asp Ala Met Val Ala Leu
 180 185 190

Leu Pro Lys Tyr Pro Asp Trp Thr Ala Ile Ile Thr Gly Arg Thr Thr
 195 200 205

Ala Glu His Gln Ser Phe Glu Asp Ala Leu Lys Ala Lys Ile Ala Ala
 210 215 220

Ala Gly Leu Gln Asp Arg Ile Leu Ile Leu Gly Glu Val Pro Asp Ile
 225 230 235 240

Arg Val Trp Tyr Arg Arg Leu Thr Leu Tyr Val Ala Pro Ser Arg Asn
 245 250 255

Glu Gly Phe Gly Leu Thr Pro Leu Glu Ala Met Ala Ser Gln Thr Ala
 260 265 270

Val Val Ala Ser Asp Ala Gly Ala Tyr Ala Glu Met Ile Val Asp Gly
 275 280 285

Thr Gly Thr Ser Val Ala Ala Gly Asp Gly Glu Ala Leu Arg Lys Ala
 290 295 300

Val Glu Pro Tyr Leu Ala Asp Pro Ala Leu Ala Glu Arg Asp Gly Glu
 305 310 315 320

Asn Ala Leu Arg His Val Arg Ala Thr Phe Pro Leu Glu Lys Glu Ala
 325 330 335

Ala Ala Ile Ser Gly Val Tyr Glu Arg Val Phe Ala Gly Lys
 340 345 350

<210> 7
<211> 351
<212> PRT
<213> *Agrobacterium tumefaciens*

5

<400> 7

ES 2 612 486 T3

Met Ser His Val Ser Leu Lys Asp Val Gln Val Leu Ala Pro Asn Phe
1 5 10 15

Lys Arg Arg Leu Ser Gly Val Thr Ser Thr Ile Val Gln Leu Ile Pro
20 25 30

Val Gln Asn Arg Leu Gly Gln Lys Val Gly Thr Ile Gly Pro Gly Leu
35 40 45

Pro Pro His Leu Pro His Val Arg Phe Arg Asp Leu Trp Arg Leu Trp
50 55 60

Gln Asn Gly Pro Ser Gly Gly Pro Arg Ile Trp His Ala Arg Arg Asn
65 70 75 80

Leu Glu Met Leu Pro Gly Ile Phe Met Arg Asp Val Leu Arg Met Lys
85 90 95

Val Lys Leu Leu Phe Thr Ser Ala Ala Gln Arg Arg His Ser Ala Tyr
100 105 110

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

Arg Ser Gly Ser Phe Leu Glu Val Pro His Arg Val Val Met His Gly
130 135 140

Val Asp Thr Glu Leu Phe His Pro Ala Thr Gly Pro Glu Asp Thr Ile
145 150 155 160

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

Val Arg His Gln Lys Gly Thr Asp Leu Phe Val Arg Ala Met Ile Glu
180 185 190

Leu Leu Pro His Tyr Pro Gln Trp Thr Ala Val Val Ser Gly Arg Val
195 200 205

Thr Ala Glu His Lys Ala Phe Gly Asp Thr Leu Lys Ala Asp Val Ala
210 215 220

Ala Ala Gly Leu Thr Asp Arg Ile Ile Phe Gln Gly Glu Val Asp Asp

ES 2 612 486 T3

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

Pro Tyr Gln Gly Ile Ser Arg Leu Ile Ala Phe Val Ile Lys Gly Ala
 20 25 30

Leu Asn Gln Gly Ser Gly Val Thr Ile Ala Cys Pro Gly Trp Leu Lys
 35 40 45

Asp Asp Val Arg Val Leu Leu Glu Asp Ala Asp Ile Pro Leu Glu Ala
 50 55 60

Val Lys Ile Ile Ala Thr Asn Gly Gln Pro Pro Leu Ala Ser Leu Trp
 65 70 75 80

Lys Leu Arg Asp Lys Phe Arg Lys Arg Arg Thr Ser Lys Arg Lys Arg
 85 90 95

Leu Trp Leu Glu Arg Tyr Gly Lys Asn Val Ala Asn Phe Val Ala Glu
 100 105 110

ES 2 612 486 T3

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

ES 2 612 486 T3

Pro Ala Lys Leu Ile Leu Thr Ala Gln Phe Gln Tyr Asp Lys Arg Ile
 370 375 380

Gln Thr Phe Ile Asp Asp Asn Gly Leu His Ala Asp Val Leu Ser Leu
 385 390 395 400

His Ser Leu Pro Asn Lys Val Leu Ala Ala Leu Tyr His Leu Ala Ser
 405 410 415

Leu Ser Val Thr Pro Thr Asn Phe Glu Gly Gly Phe Pro Phe Thr Phe
 420 425 430

Ser Glu Ala Tyr Ser Val Gly Thr Pro Ser Ile Met Ser Arg Ile Pro
 435 440 445

Val Val Gln Glu Val Ile Asp Asp Pro Glu Leu Gln Asp Leu Met Thr
 450 455 460

Phe Asn Pro Leu Asp Val Asp Asp Ile Ala Asn Lys Met Ile Phe Gly
 465 470 475 480

Leu Asp Asn Arg Gln Arg Leu Phe Glu Ala Gln Ser Ser Leu Tyr Ala
 485 490 495

Lys Leu Ser Ala Arg Thr Trp Gln Val Ala Ala Asn Asp Tyr Leu Ser
 500 505 510

Leu Leu Lys Ser Val Ala Asp
 515

- <210> 9
- <211> 410
- <212> PRT
- <213> *Brucella melitensis*
- <400> 9

5

ES 2 612 486 T3

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

ES 2 612 486 T3

Leu Ser Asn Asp Tyr Pro Gln Met Arg Tyr Ile Ser Asn Arg Phe Glu
340 345 350

Ile Pro Met Gln Tyr Phe Asn Ala Arg Ser Val Lys Glu Met Ala Ser
355 360 365

Ala Leu Lys Gln Met Glu Glu Thr Pro Ile Asp Val Gly Leu Leu Pro
370 375 380

Ser Arg Glu Thr Leu Ser Leu His Ser Trp Glu Ala His Ala Ser Glu
385 390 395 400

Tyr Trp Asp Val Ile Val Arg Ala Ala Ala
405 410

<210> 10

<211> 377

<212> PRT

<213> Brucella melitensis

<400> 10

5

ES 2 612 486 T3

Met Pro His Leu Tyr Trp Arg Asn Met Arg Val Leu His Phe Phe Lys
 1 5 10 15

Thr Tyr Trp Pro Asp Thr Phe Gly Gly Ile Glu Arg Thr Ile His Ala
 20 25 30

Ile Ala Lys Gly Val Ala Glu His Gly Ile Ala Ser Asp Val Leu Ser
 35 40 45

Leu Ser Ala Lys Pro Glu Glu Asn Thr Arg Asn Phe Asp Gly His Met
 50 55 60

Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Asp Leu Glu Phe Ala Ser Thr Gly Leu Ser
 65 70 75 80

Arg Asp Val Phe Ser Arg Phe Arg Glu Leu Ser Ser Gln Ala Asp Val
 85 90 95

Ile His Tyr His Phe Pro Trp Pro Met Ser Asp Ile Val Gln Ile Gly
 100 105 110

Val Arg Pro Asp Lys Pro Thr Ile Val Thr Tyr His Ser Asp Ile Val
 115 120 125

Lys Gln Lys Leu Leu Leu Gln Phe Tyr Arg Pro Leu Met Asn Arg Phe
 130 135 140

Leu Gly Ser Val Asp Arg Ile Val Ala Thr Ser Pro Asn Tyr Leu Ala

ES 2 612 486 T3

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

Ile Ser Arg Tyr Val Met Glu Asn Cys Arg Glu Leu Tyr Glu Arg Gly
20 25 30

His Glu Leu Val Leu Tyr Thr Pro Glu Lys Pro Arg Val Gln Leu Ser
35 40 45

Ser Ser Glu Gly Phe Asp Phe Arg Val Ser Asn Phe Gln Gly Pro Ala
50 55 60

Gly Arg Leu Phe Trp Ser Gln Thr Val Leu Pro Leu Gln Leu Arg Lys
65 70 75 80

Asp Arg Ile Asp Val Phe Trp Gly Pro Ala His Arg Leu Pro Ala Leu
85 90 95

Lys Gly Ala Ile Pro Ser Val Val Ser Ile His Asp Leu Val Trp Tyr
100 105 110

Tyr Ala Ser Ser Thr Met Arg Leu Gln Gly Trp Leu Ala Asp Arg Phe
115 120 125

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

Tyr Ala Thr Ser Ser Ala Ile Ser Ser Val Phe Pro Gln Tyr Thr Ser
145 150 155 160

Lys Ile Gln Met Val Tyr Pro Gly Val Ser His Phe Asn Arg Ile Gly
165 170 175

Thr Ser Asn Ile Leu Lys Glu His Arg Ile Asn Lys Ser Tyr Gly Leu
180 185 190

Phe Ile Gly Thr Leu Glu Pro Arg Lys Asn Leu Ile Arg Leu Leu Glu
195 200 205

Ala Tyr Ala Asn Leu Pro Glu Cys Val Arg Asn Asn Phe Leu Leu Val
210 215 220

Val Ala Gly Gly Lys Gly Trp Asn Leu Gly Asp Ile Gly Lys Thr Ile
225 230 235 240

Asn Arg Leu Gly Ile Ala Glu Tyr Thr Arg Leu Thr Gly Tyr Val Thr
245 250 255

ES 2 612 486 T3

Asp Ser Asp Leu Asn Asp Leu Tyr Arg Asn Ala Arg Thr Leu Leu Met
260 265 270

Pro Ser Leu Tyr Glu Gly Phe Gly Leu Pro Ile Ile Glu Ala Gln Ala
275 280 285

Tyr Gly Val Pro Val Ile Thr Ser Asn Cys Ser Ser Met Pro Glu Val
290 295 300

Ala Gly Asp Ala Ala Ile Leu Val Asp Pro Leu Asn Val Ala Glu Ile
305 310 315 320

Ser Asn Ala Leu Tyr Arg Ile Ala Thr Asp Asn Lys Leu Trp Gln Arg
325 330 335

Lys Ser Leu Leu Ala Leu Gln Asn Ile Glu Arg Phe Asn Trp His Asn
340 345 350

Ser Ile Glu Lys Leu Glu Ser Val Phe Ile Lys Ala Arg Glu Ser Lys
355 360 365

Leu Met Thr Tyr
370

- <210> 12
- <211> 362
- <212> PRT
- <213> *Brucella melitensis*

5

<400> 12

ES 2 612 486 T3

Met Lys Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr Gly Gln Asp Gly Ala
 1 5 10 15

Tyr Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gln Lys Gly Tyr Ala Val His Gly Ile
 20 25 30

Lys Arg Arg Thr Ser Gln Phe Asn Thr Ala Arg Ile Asp His Leu Tyr
 35 40 45

His Asp Pro His Glu Gln Gly Val Asp Leu Thr Leu His His Gly Asp
 50 55 60

Leu Thr Asp Thr Ser Ser Leu Val Arg Ile Met Gln Leu Val Arg Pro
 65 70 75 80

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

Glu Glu Pro Glu Tyr Thr Ala Asn Ser Asp Ala Leu Gly Ala Leu Arg
 100 105 110

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

<210> 13
<211> 380
<212> PRT
<213> *Brucella melitensis*

<400> 13

5

ES 2 612 486 T3

Met Val Thr Asn Phe Ser Pro Leu Arg Asn Asp Pro Tyr Met Asp Ile
1 5 10 15

Pro Val Tyr Ser Pro Tyr Leu Cys Gly Asn Phe Lys Lys Tyr Val Asn
20 25 30

Glu Cys Leu Asp Thr Gly Trp Ile Ser Ser Arg Gly Glu Phe Ile Ser
35 40 45

Arg Phe Glu Asp Ala Phe Ala Gln Tyr Val Asp Val Pro Ser Ala Ala
50 55 60

Ser Val Ala Asn Gly Thr Val Ala Leu His Leu Ala Leu Asp Ala Leu
65 70 75 80

Gly Ile Gly Ala Gly Asp Glu Val Ile Val Pro Thr Phe Thr Tyr Ile
85 90 95

Ala Ser Val Asn Thr Ile Leu Gln Thr Gly Ala Thr Pro Val Tyr Val
100 105 110

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

Ala Ile Thr Glu Arg Thr Lys Ala Val Met Val Val His Leu Tyr Gly
130 135 140

His Pro Cys Asp Met Asp Ser Ile Arg Glu Ile Cys Asp Glu Lys Ser
145 150 155 160

Leu Leu Leu Val Glu Asp Cys Ala Glu Gly Phe Gly Thr Lys Trp Lys
165 170 175

Asn Ser His Val Gly Thr Phe Gly Asp Val Ala Thr Phe Ser Phe Phe
180 185 190

Gly Asn Lys Thr Ile Thr Thr Gly Glu Gly Gly Met Val Leu Ala Arg
195 200 205

Asn Pro Gln Val Met Glu Lys Cys Arg His Leu Lys Ser Gln Gly Thr
210 215 220

Ser Pro Thr Arg Glu Tyr Trp His Asp Ala Leu Ala Tyr Asn Tyr Arg

ES 2 612 486 T3

Met Arg Arg Phe Arg Met Ile Ser Tyr Met Ala Asn Val Trp Lys Val
 1 5 10 15

Arg His Phe Trp Trp His Leu Ser Met Ser Asp Leu Arg Gly Arg Phe
 20 25 30

Arg Arg Ser Ser Leu Gly Ile Leu Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Ala
 35 40 45

Leu Thr Leu Leu Leu Ser Phe Val Phe Ser Lys Leu Leu Asn Gln Ser
 50 55 60

Ile Ser Ala Tyr Ala Pro Tyr Ile Leu Ser Gly Ile Ile Ile Trp Glu
 65 70 75 80

ES 2 612 486 T3

Tyr Ile Ser Phe Thr Val Val Gly Gly Ser Thr Ala Leu Val Gln Ala
 85 90 95
 Asp Ala Tyr Ile Lys Gln Thr Arg Asn Pro Leu Ala Ile Tyr Thr Leu
 100 105 110
 Arg Asn Thr Val Ser Gly Leu Val Val Leu Ser Val Ala Ser Ile Ser
 115 120 125
 Leu Phe Gly Trp Val Leu Ile Met Phe Pro Glu Asn Phe Ser Leu Ser
 130 135 140
 Trp Leu Ala Ile Pro Thr Leu Leu Pro Ile Leu Ala Leu Ile Val Trp
 145 150 155 160
 Pro Leu Ala Thr Ile Val Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Phe Arg Asp Leu
 165 170 175
 Pro Asn Ala Leu Ala Leu Val Leu Gln Ala Ala Trp Phe Val Ser Pro
 180 185 190
 Val Tyr Phe Lys Glu Ser Met Phe Arg Gln Gly Gly Leu Asn Ala Phe
 195 200 205
 Val Asp Tyr Asn Pro Ile Tyr His Val Met Gln Ile Leu Arg Ala Pro
 210 215 220
 Val Leu Tyr Gly Glu Trp Pro Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Trp Cys Leu
 225 230 235 240
 Gly Val Ser Leu Leu Leu Thr Cys Val Ala Val Ala Val Gly Met Arg
 245 250 255
 Ala Glu Lys Arg Ala Ile Phe Tyr Leu
 260 265

<210> 15
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> *Brucella melitensis*

5

<400> 15

ES 2 612 486 T3

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

Ile Gly Leu Phe Leu Leu Ser His Leu Leu Pro Ala Asn Phe Leu Ala
20 25 30

Ala Arg Met Ser Ser Arg Ser Asn His Ser Ile Ala Ala Arg Gln Ile

ES 2 612 486 T3

Asp His Pro Leu Ala Gln Leu Thr Phe Leu Leu Val Ala Ala Val Ala
305 310 315 320

Thr Leu Ile Leu Leu Leu Asp Phe Arg Gly Arg Phe Arg Lys Leu
325 330 335

<210> 16
<211> 622
<212> PRT
<213> *Brucella melitensis*

5

<400> 16

Met Ser Leu Lys Tyr Pro Trp Gln Arg Leu Ala Leu Leu Pro Arg Ile
1 5 10 15

Ser Lys Gln Ile Ile Leu Val Leu Ser Asp Cys Leu Leu Leu Leu Ala
20 25 30

Ser Ala Tyr Leu Ala Phe Val Val Arg Phe Gly Phe Val Phe Val Pro
35 40 45

Asn Leu Ala Gln Leu Phe Leu Ile Leu Ile Ala Pro Leu Leu Ala Ile
50 55 60

Pro Val Phe Ile Arg Phe Gly Leu Tyr Arg Ala Ile Ile Arg Tyr Leu
65 70 75 80

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

Leu Phe Trp Val Ala Leu Val Phe Leu Met Glu Leu Tyr Gly Ser Thr
100 105 110

Gly Leu Pro Arg Ser Val Pro Leu Leu Tyr Trp Leu Leu Ser Thr Val
115 120 125

Phe Ile Ser Ala Ser Arg Phe Gly Ala Lys Trp Leu Leu Arg Thr Ala
130 135 140

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

Glu Pro Ala Arg Gln Leu Ala Thr Ala Leu Arg Ser His Ser Asp Thr
165 170 175

Leu Val Val Gly Phe Ile Asp Pro Ala Gly Gln Leu Ala Gly Met Asp
180 185 190

10

ES 2 612 486 T3

Ile Ile Gly Leu Arg Val Tyr Arg Thr Glu Glu Ile Pro Ser Leu Ile
 195 200 205

Glu Asn Tyr Gly Ile Lys Gln Val Val Val Ser Glu Pro Ala Leu Glu
 210 215 220

Gln Lys Glu Arg Gln Glu Phe Ala Arg Leu Leu Gly Arg Leu Pro Val
 225 230 235 240

Asn Thr Arg Ile Leu Pro Pro Ile Ala Asp Leu Thr Ala Gly Lys Tyr
 245 250 255

Leu Val Ser Ala Leu Arg Asn Val Glu Ile Asp Asp Leu Leu Gly Arg
 260 265 270

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

Arg Arg Ile Met Ile Thr Gly Ala Gly Gly Ser Ile Gly Ser Gln Leu
 290 295 300

Cys Leu Thr Ile Ala Gln Trp Asn Pro Ala Ala Ile Val Leu Phe Glu
 305 310 315 320

Ser Ser Glu Phe Ala Leu Tyr Gln Ile Asp Arg Gln Leu Arg Gln Phe
 325 330 335

Ala Ser Cys Thr Val Val Pro Val Leu Gly Ser Val Arg Asp Arg Ala
 340 345 350

Cys Val Glu Lys Pro Ile Arg Asp His Ser Ile Asp Thr Val Tyr His
 355 360 365

Cys Ala Ala Tyr Lys His Val Pro Leu Val Glu Arg Asn Pro Leu Val
 370 375 380

Gly Ile Phe Asn Asn Val Phe Gly Thr Leu Glu Val Ala Glu Ala Ala
 385 390 395 400

Leu Asn Thr Asp Val Glu Arg Met Val Leu Ile Ser Ser Asp Lys Ala
 405 410 415

Val Arg Pro Thr Asn Val Met Gly Ala Thr Lys Arg Trp Ala Glu Leu
 420 425 430

Val Val Tyr Tyr Tyr Gly Arg Leu Ala Glu Gln Ala Gly Lys Lys Lys
 435 440 445

Ala Phe Tyr Ser Val Arg Phe Gly Asn Val Leu Gly Ser Asn Gly Ser

ES 2 612 486 T3

450		455		460											
Val	Val	Pro	Leu	Phe	Arg	Glu	Gln	Ile	Ala	Asn	Gly	Gly	Pro	Val	Thr
465					470					475					480
Leu	Thr	His	Glu	Asp	Met	Thr	Arg	Tyr	Phe	Met	Ser	Ile	Lys	Glu	Ala
			485						490					495	
Ala	Glu	Leu	Ile	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Ile	Ala	Gln	Ser	Gly	Asp	Thr
			500					505					510		
Val	Leu	Leu	Glu	Met	Gly	Glu	Pro	Val	Lys	Ile	Arg	Asp	Leu	Ala	Glu
		515					520					525			
Asn	Met	Ile	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Thr	Val	Arg	Asn	Glu	Glu	Asn	Pro
	530					535					540				
Gln	Gly	Asp	Ile	Ala	Ile	Glu	Val	Thr	Gly	Ile	Arg	Glu	Gly	Glu	Lys
545					550					555					560
Met	Tyr	Glu	Glu	Leu	Phe	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Thr	Arg
				565					570						575
His	Pro	Lys	Ile	Met	Arg	Ala	Pro	Gln	Gly	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Asp
			580					585					590		
Ile	Gln	Glu	Ser	Leu	Ala	Val	Leu	Arg	Thr	Ala	Met	Glu	Lys	Lys	Asp
		595					600					605			
Ile	Glu	Met	Val	Arg	Lys	Val	Leu	Phe	Glu	Val	Ile	Ala	Ser		
	610					615						620			

- 5 <210> 17
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Cebador de PCR
- <400> 17
- ctggcgtcag caatcagag 19
- 15 <210> 18
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 20 <220>
- <223> Cebador de PCR
- <400> 18

ES 2 612 486 T3

gtgcaacgac ctcaactcc 20

5 <210> 19
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 19
ggaagttgag gtcggtgcac acgccatcga accttatctg 40

15 <210> 20
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 20
cggctatcgt gcgattct 18

25 <210> 21
<211> 239
<212> PRT
<213> *Brucella abortus*

30 <400> 21

ES 2 612 486 T3

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

Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Lys Glu Leu Pro Val Lys Ala Glu
 20 25 30

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

Arg Ile Tyr Lys Arg Arg Leu His Thr Pro Arg Tyr Pro Phe Ala Leu
 50 55 60

Ser Arg Asn Glu Ile Ala Cys Phe Leu Ser His Arg Lys Ala Trp Gln
 65 70 75 80

Ala Ile Ile Asp Arg Lys Leu Asp Ala Gly Phe Ile Val Glu Asp Asp
 85 90 95

Ile Ala Leu Thr Glu Asn Phe Met Gly Ala Tyr Arg Ala Ala Val Asp
 100 105 110

His Leu Glu Pro Gly Gly Phe Ile Arg Phe Thr Phe Arg Asp Asp Arg
 115 120 125

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

Pro Asn Pro Ile Gly Leu Gly Met Val Ala Gln Phe Val Ser Tyr Asp
 145 150 155 160

Ala Ala Gln Lys Leu Leu Asp Ile Thr Gln Thr Phe Asp Arg Pro Val
 165 170 175

Asp Thr Thr Val Gln Met Arg Trp Val Thr Gly Leu Gln Pro Leu Ser
 180 185 190

Val Ile Pro Gly Gly Val Lys Glu Ile Ser Ser Gln Leu Gly Gly Thr
 195 200 205

Thr Ile Gln His Lys Lys Asn Phe Ser Asp Lys Leu Ala Arg Glu Ile
 210 215 220

Leu Arg Pro Ile Tyr Arg Met Arg Val Arg Ala Tyr Ser Ser Lys
 225 230 235

<210> 22
 <211> 352

ES 2 612 486 T3

<212> PRT

<213> *Bartonella henselae*

<400> 22

5

Met His Val Ser Leu Glu Glu Thr Glu Ile Ile Ala Pro His Phe Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Leu Ser Gly Ile Thr Ser Thr Val Val Gln Leu Ile Pro Leu
 20 25 30

Gln Arg Lys Gln Gly Ile Arg Ile Ala Thr Phe Gly Phe Gly Leu Pro
 35 40 45

Asn Asn Leu Pro Ala Leu Ala Phe Lys Asp Leu Phe Gly Leu Trp Lys
 50 55 60

Ser Pro Ile Gly Lys Pro Phe Arg Ile Trp His Ala Arg Arg Asn Ile
 65 70 75 80

Glu Met Leu Cys Gly Ile Phe Leu Arg Asp Val Leu Arg Met Lys Leu
 85 90 95

Lys Leu Leu Phe Thr Ser Ala Ser Gln Arg His His Lys Ser Phe Thr
 100 105 110

Lys Trp Leu Ile Arg Arg Met Asp Lys Val Ile Ala Thr Ser Ile Arg
 115 120 125

ES 2 612 486 T3

Thr Gly Thr Tyr Leu Glu Val Pro His Gln Val Ile Met His Gly Val
 130 135 140

Asp Val Arg Arg Phe Ser Pro Pro Lys Thr Phe Glu Asp Cys Phe Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Phe Pro Gly Lys Tyr Ala Val Gly Cys Phe Gly Arg Val
 165 170 175

Arg Tyr Ser Lys Gly Thr Asp Leu Phe Val Asp Ala Met Ile Ala Leu
 180 185 190

Leu Pro Arg Tyr Pro Glu Trp Thr Ala Leu Ile Ala Gly Arg Thr Ile
 195 200 205

Glu Gln His Tyr Tyr Phe Glu Lys Lys Leu Arg Gln Lys Ile Ala Glu
 210 215 220

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

Pro Leu Trp Tyr Arg Arg Leu Ser Leu Tyr Val Ala Pro Ser Arg Thr
 245 250 255

Glu Gly Phe Gly Leu Thr Pro Leu Glu Ala Met Ala Ser Gln Thr Ala
 260 265 270

Val Val Ala Ser Asp Ala Gly Ala Tyr Lys Glu Leu Val Val Glu Gly
 275 280 285

Thr Gly Thr Ile Val Gln Ala Gly Asp Gly Gly Ala Leu Thr Ala Ala
 290 295 300

Ile Glu Pro Tyr Phe Ala Asp Leu Glu Lys Thr Met Ala Ala Gly Glu
 305 310 315 320

Lys Ala Leu Ala His Val Arg Thr His Phe Pro Leu Glu Lys Glu Ala
 325 330 335

Ala Ala Ile Arg Asn Val Tyr Glu Thr Val Phe Ala Gln Lys Thr Leu
 340 345 350

<210> 23
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> *Ochrobactrum anthropi*

5

<400> 23

ES 2 612 486 T3

Met Asn Glu Thr Arg Pro Asp Ile Thr Ala Asn Asp Gly Pro Gln Arg
1 5 10 15

Ala Val Lys Ala Phe Ile Ile His Leu Glu Arg Ala Thr Asp Arg Gln
20 25 30

Pro Gln Val Glu Glu Leu Val Arg Arg Leu Pro Val Glu Thr Asp Val
35 40 45

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

Val Tyr Arg Arg Ser Ala His Lys Pro Arg Tyr Pro Phe Gln Leu Ser
65 70 75 80

Thr Asn Glu Ile Ala Cys Phe Leu Ser His Arg Lys Ala Trp Gln Ala
85 90 95

Ile Val Asp Gln Glu Leu Asp Ala Gly Leu Val Leu Glu Asp Asp Val
100 105 110

Glu Leu Thr Pro Glu Phe Ala Ala Ala Tyr Ser Ala Ala Cys Gln Ile
115 120 125

Leu Lys Ala Asp Ser Phe Ile Arg Phe Pro Phe Arg Glu Arg Glu Ser
130 135 140

Gly Arg Val Val Leu Asn Thr Glu Thr Leu Arg Ile Ile Glu Pro Val
145 150 155 160

Pro Val Gly Leu Gly Met Val Ala Gln Leu Val Gly Arg Glu Ala Ala
165 170 175

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

Thr Ala Gln Met Asn Trp Val Thr Gly Leu Lys Pro Leu Ser Val Leu
195 200 205

Pro Gly Gly Val Lys Glu Ile Ser Val Gln Leu Gly Gly Ser Thr Ile
210 215 220

Gln Lys Ser Arg Ser Leu Pro Asp Lys Leu Lys Arg Glu Ile Leu Arg
225 230 235 240

Pro Leu Tyr Arg Trp Lys Ile Lys Ser Arg Ser Arg Ala Ala Ile
245 250 255

<210> 24
<211> 255
<212> PRT
<213> *Ochrobactrum intermedium*
<400> 24

5

ES 2 612 486 T3

Met Asn Glu Thr Arg Pro Asp Ile Thr Ala Ser Asp Gly Pro Gln Arg
 1 5 10 15

Ala Val Lys Ala Phe Ile Ile His Leu Glu Arg Ala Thr Asp Arg Gln
 20 25 30

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

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

Val Tyr Arg Arg Ser Ala His Lys Pro Arg Tyr Pro Phe Gln Leu Ser
 65 70 75 80

Thr Asn Glu Ile Ala Cys Phe Leu Ser His Arg Lys Ala Trp Gln Ala
 85 90 95

Ile Val Asp Gln Gly Leu Asp Ala Gly Leu Val Leu Glu Asp Asp Val
 100 105 110

Glu Leu Thr Pro Glu Phe Ala Ala Ala Tyr Ser Ala Ser Cys Gln Leu
 115 120 125

Leu Lys Ala His Ser Phe Ile Arg Phe Pro Phe Arg Glu Arg Glu Ser
 130 135 140

Gly Arg Val Val Leu Thr Thr Glu Gly Val Arg Ile Ile Glu Pro Val
 145 150 155 160

Pro Val Gly Leu Gly Met Val Ala Gln Leu Val Gly Arg Glu Ala Ala
 165 170 175

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

Thr Ala Gln Met Asn Trp Val Thr Gly Leu Lys Pro Leu Ser Val Leu
 195 200 205

Pro Gly Gly Val Lys Glu Ile Ser Val Gln Leu Gly Gly Ser Thr Ile
 210 215 220

Gln Lys Ser Arg Ser Leu Pro Asp Lys Leu Lys Arg Glu Ile Leu Arg
 225 230 235 240

Pro Leu Tyr Arg Trp Lys Ile Lys Ser Arg Ser Arg Ala Ala Val
 245 250 255

ES 2 612 486 T3

<210> 25
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> *Agrobacterium radiobacter*

5

<400> 25

Met Gln Thr Tyr Lys Ile Gly Phe Ser Ala Ala Ala Pro Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Ala His Ala Gly Leu Glu Pro Asp Gln Val Pro Leu Gly Thr Ile Asn
 20 25 30

Ala Arg Pro Ala Gln Ala Asn Ile Arg Gly Phe Ile Ile His Leu Asp
 35 40 45

Arg Ala Arg Asp Arg Leu Pro Gln Val Glu Arg Leu Ala Ala Met Leu
 50 55 60

Pro Val Arg Ser Asp Ile Ile Gln Ala Val Asp Ala Ser Ala Phe Pro
 65 70 75 80

Asp Ala Asp Ile Asp Leu Val Tyr Arg Arg His Leu His Thr Pro Arg
 85 90 95

Tyr Pro Phe Glu Met Ser Val Gly Glu Ile Ala Cys Phe Leu Ser His
 100 105 110

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

Val Phe Glu Asp Asp Val Glu Ile Asp Ala Ser Phe His Ala Ala Phe
 130 135 140

Ala Ala Ala Gln Ala Cys Leu Thr Pro Gly Ala Phe Ile Arg Phe Pro
 145 150 155 160

Phe Arg Met Gly Lys Glu His Gly Glu Cys Val Leu Thr His Gly Gln
 165 170 175

Ala Ser Val Ile Gln Pro Gly Arg Val Gly Leu Gly Met Val Ala Gln
 180 185 190

Leu Val Ser Arg Asp Ala Ala Ile Arg Leu Leu Glu Ala Thr Ala Leu
 195 200 205

Phe Asp Arg Pro Val Asp Thr Thr Val Gln Met Arg Trp Ile Thr Gly

ES 2 612 486 T3

210 215 220

Leu Ser Pro Leu Ala Val Leu Pro Gly Gly Val His Glu Ile Ser Ser
225 230 235 240

Gln Leu Gly Gly Ser Thr Ile Lys Ser Arg Lys Thr Val Phe Glu Lys
245 250 255

Leu Ser Arg Glu Ile Leu Arg Pro Leu Tyr Arg Ala Lys Ile Ala Ile
260 265 270

Arg Ser Arg Arg Ser Ser
275

5 <210> 26
<211> 252
<212> PRT
<213> *Brucella melitensis* 16M

<400> 26

ES 2 612 486 T3

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

Ala Ser Ala Phe Lys Glu Arg Ser Val Lys Thr Leu Val Asn Ala Leu
 20 25 30

Leu Ser Met Arg Arg Ser Ala Gly Ala Asn Ile Glu Asp Ile His Ala
 35 40 45

Leu Lys Gly Ile Ser Val Asp Ile Ala Arg Gly Glu Arg Val Ala Leu
 50 55 60

Ile Gly His Asn Gly Ala Gly Lys Ser Thr Phe Leu Lys Thr Ile Ala
 65 70 75 80

Gly Leu Tyr Pro Ile Ser Ser Gly Thr Leu Lys Val Thr Gly Thr Val
 85 90 95

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

Arg Glu Asn Ile Leu Tyr Arg Gly Leu Leu Leu Gly Leu Thr Pro Arg
 115 120 125

Phe Met Arg Glu Ile Glu Asp Glu Ile Ile Glu Phe Ala Asp Leu Gly
 130 135 140

Asp Phe Ile Asp Tyr Pro Ile Lys Thr Tyr Ser Ala Gly Met Gln Val
 145 150 155 160

Arg Leu Ala Phe Ala Ile Ser Thr Ala Val Asp Gly Asp Ile Leu Leu
 165 170 175

Leu Asp Glu Val Ile Gly Ala Gly Asp Ala Ala Phe Met Thr Lys Ala
 180 185 190

Lys Ala Arg Ile Met Asn Met Val Glu Lys Ala Glu Ile Met Val Leu
 195 200 205

Ala Ser His Asp Leu Ala Asn Val Arg Gln Leu Cys Thr Arg Ala Leu
 210 215 220

Val Phe Lys Ala Gly Thr Ile Ala Phe Asp Gly Arg Val Glu Asp Ala
 225 230 235 240

Ile Ser Phe Tyr Asn Ser Gly Met Gly Ala Ile Ala
 245 250

ES 2 612 486 T3

<210> 27
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> *Brucella melitensis* 16M

5

<400> 27

Met Ile Arg Asp Ser Gly Ala Pro Arg Arg Val Leu Trp Leu Leu Asn
 1 5 10 15

His Thr Thr Leu Arg Glu Cys Glu Val Pro Leu Leu Gln Ser Met Gly
 20 25 30

Phe Glu Ile Phe Thr Pro Lys Arg Phe Pro Arg Asn Ser Asp Asn Arg
 35 40 45

Ser Ala Ser Val Ser Phe Glu Thr Asp Glu Ser Leu Thr Ile Pro Ala
 50 55 60

Ser Val Ile Asp Glu Leu Asn Ser Tyr Asp Ser Tyr Gln Ala Pro Val
 65 70 75 80

Asn Pro Arg Ile Asp Phe Leu Ile Asn Tyr Tyr Phe Glu Asn Ala Ile
 85 90 95

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

Gly Arg Ile Leu Leu Arg Ala Phe Gly Leu Thr Ser Glu Thr Trp Thr
 115 120 125

Tyr Phe Asp Phe Ala Asn Phe Val Ala Gly Ser Phe Phe Lys Arg Thr

ES 2 612 486 T3

130						135						140					
Trp	Met	Lys	Ala	Ser	Asn	Gln	Phe	Trp	Phe	Ala	Ala	Ser	Tyr	Ser	Ser		
145					150					155					160		
Leu	Ile	Glu	Ile	Glu	Pro	Asn	Phe	Ile	Arg	Glu	Arg	Thr	Val	Leu	Leu		
				165					170					175			
Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Lys	Gln	Asp	Thr	Trp	Arg		
			180					185					190				
Gly	Gly	Asp	Lys	Arg	Ile	Met	Phe	Val	Cys	Pro	Asp	Ile	Glu	Thr	Tyr		
		195					200					205					
Pro	Glu	Ala	Lys	Ala	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ser	Lys	His	Val	Phe	Gly	Asp		
	210					215					220						
Leu	Ser	His	Val	Ile	Cys	Gly	Asn	Gln	Thr	Ile	Pro	Val	Val	Asp	Asp		
225					230					235					240		
Asp	Asn	Val	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Asp	Gly	Gly	Arg	Leu	Pro		
				245					250					255			
Ile	Ala	Met	Ser	Cys	Thr	Asn	Cys	Ser	Ala	Asn	Cys	Thr	Asn	Val	Thr		
			260					265					270				
Gln	Val	Gly	Met	Gln	Ser	Arg	Val	Ser	Ile	Tyr	Ala						
		275					280										

<210> 28
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> *Brucella melitensis* 16M

5

<400> 28

ES 2 612 486 T3

Met Ile Ile Ser Met His Tyr Arg Ser Leu Ile Pro Gly Arg Phe Leu
85 90 95

Lys Leu Ala Lys Lys Gly Ser Val Asn Leu His Pro Ser Leu Leu Pro
100 105 110

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

Ser Glu Thr Gly Phe Ser Tyr His Arg Met Asp Glu Asn Phe Asp Thr
130 135 140

Gly Ala Ile Leu Leu Gln Glu Arg Ile Ser Val Glu Glu Thr Asp Thr
145 150 155 160

Ala Phe Ser Leu Phe His Arg Gln Ile Ala Arg Ala Met Leu Arg Leu
165 170 175

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

Leu Gly Glu Ala Ser Tyr Tyr Ala Arg Glu Leu Pro Phe Gly Gly Val
195 200 205

Ile Asp Pro Arg Trp Ser Glu Val Gln Ile Asp Arg Phe Ile Arg Ala
210 215 220

Met Phe Phe Pro Pro Phe Pro Pro Ala Val Leu Lys Ile Asp Gly Lys
225 230 235 240

Val Tyr Tyr Val Pro Ser Ile Asp Ile Tyr Arg Ser Leu Met Arg Gly
245 250 255

Ile Pro Ser

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende una bacteria del género *Brucella* que lleva un gen inactivado que codifica una glicosiltransferasa implicada en la síntesis del núcleo del LPS de dicha bacteria,
5 en donde dicha glicosiltransferasa se selecciona entre el grupo que consiste en la glicosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y sus homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 % de identidad con SEQ ID NO:1, y
10 en donde dicho gen inactivado que codifica una glicosiltransferasa implicada en la síntesis del núcleo del LPS de dicha bacteria da como resultado la síntesis de un LPS que tiene un núcleo modificado.
2. La vacuna según la reivindicación 1, en donde dicha glicosiltransferasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad con SEQ ID NO:1.
3. La vacuna según la reivindicación 1, en donde dicha glicosiltransferasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO:1.
15
4. La vacuna según la reivindicación 1, en donde dicha glicosiltransferasa tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
- 20 5. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde un gen codificador de una proteína implicada en la síntesis del polisacárido O del LPS está inactivado.
6. La vacuna según la reivindicación 5, en donde dicha proteína implicada en la síntesis del polisacárido O del LPS es una perosamina sintetasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 o un homólogo del mismo
25 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13.
7. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha bacteria del género *Brucella* se selecciona entre el grupo que consiste en las bacterias de las especies *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*,
30 *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella ceti*, *Brucella microti* y *Brucella canis*.
8. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha bacteria del género *Brucella* es de la especie *Brucella abortus*.
- 35 9. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método para el tratamiento de brucelosis en el cuerpo humano o animal.

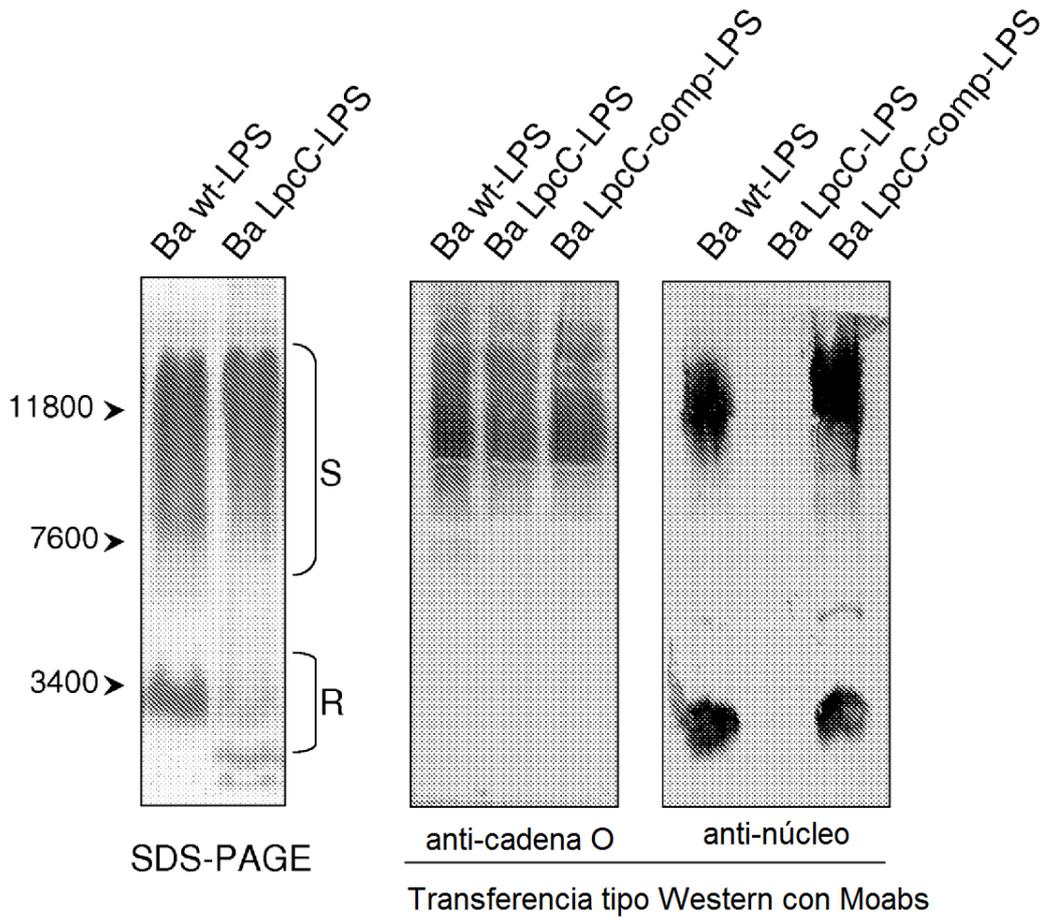


FIG. 1

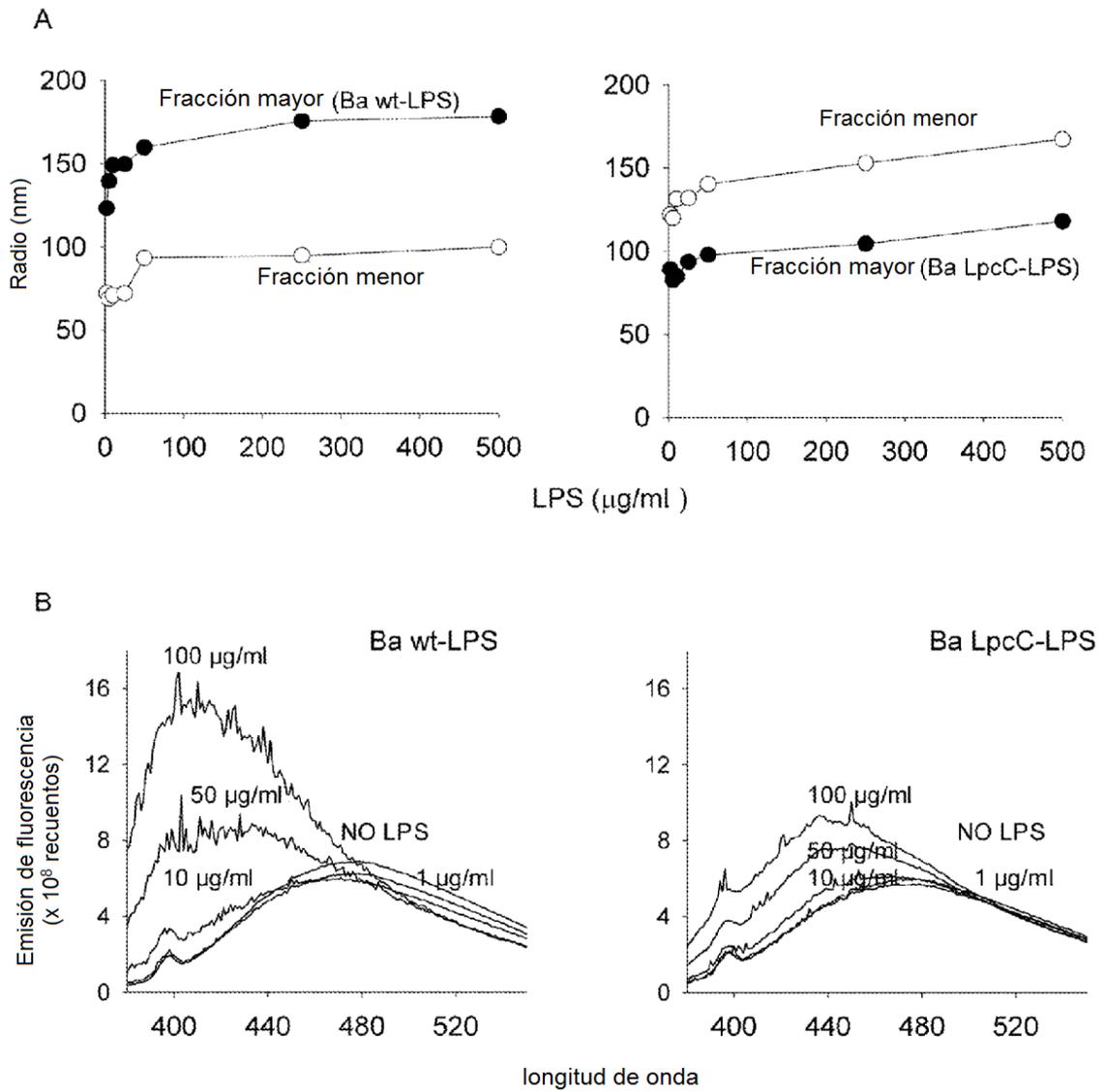


FIG. 2

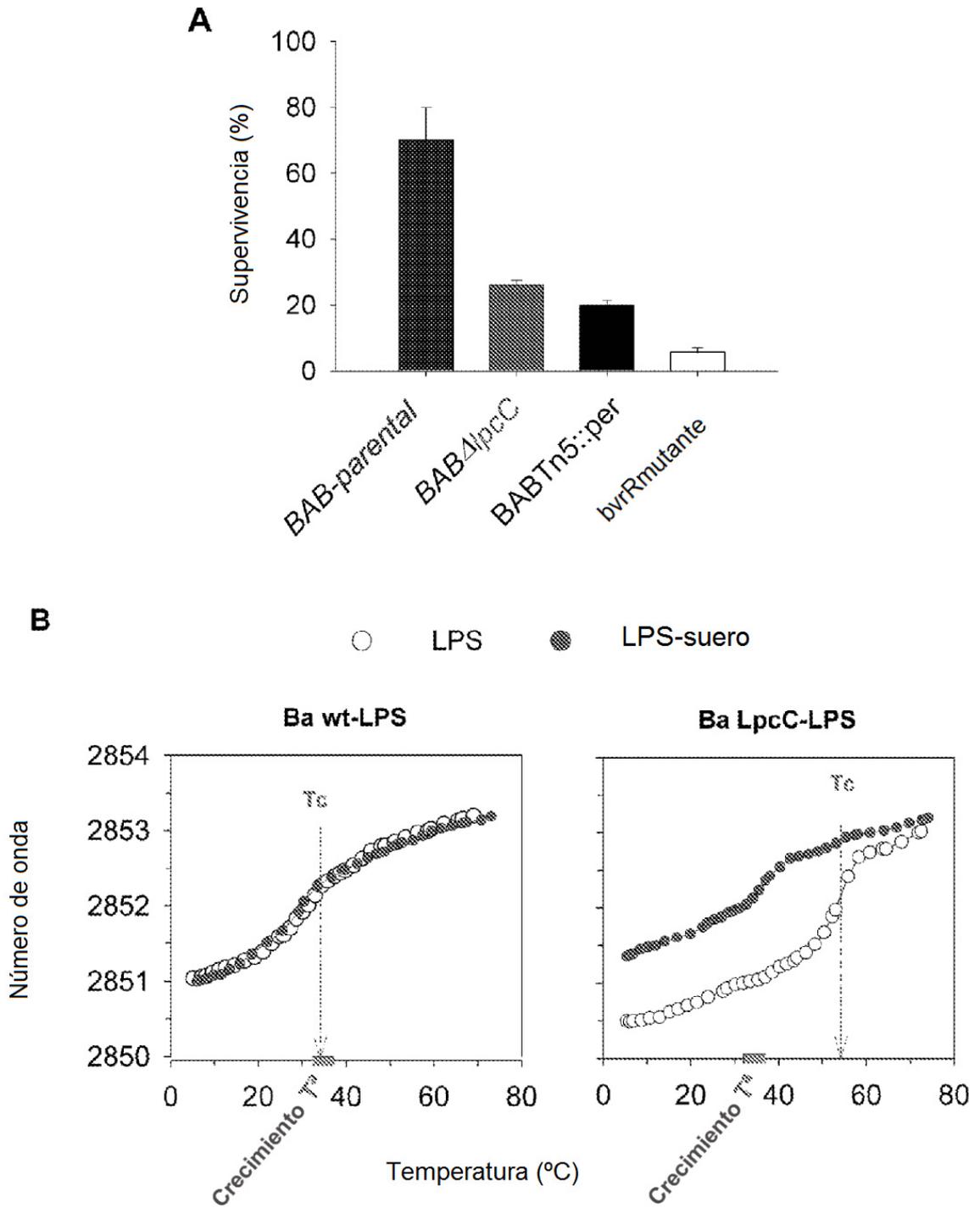
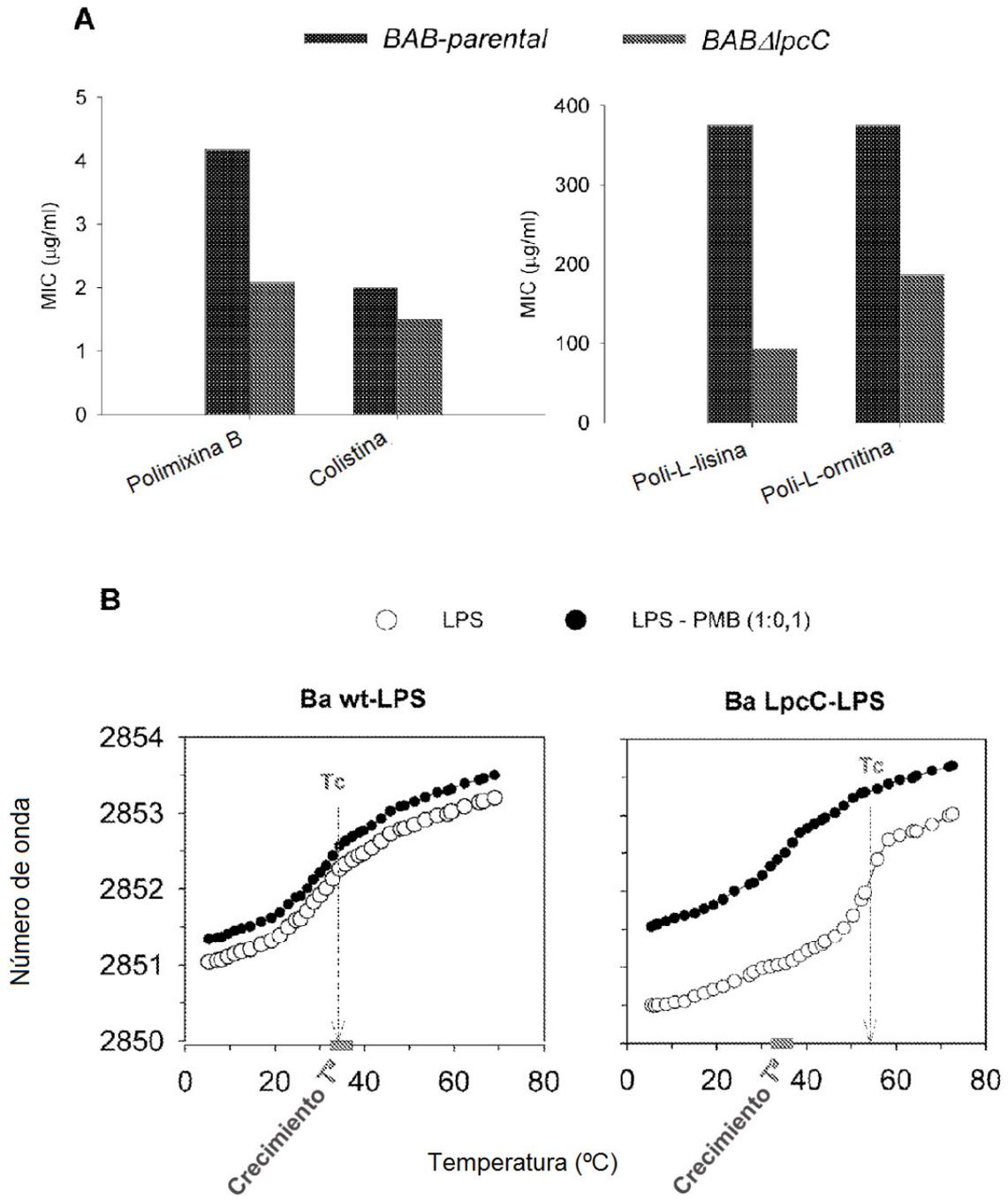
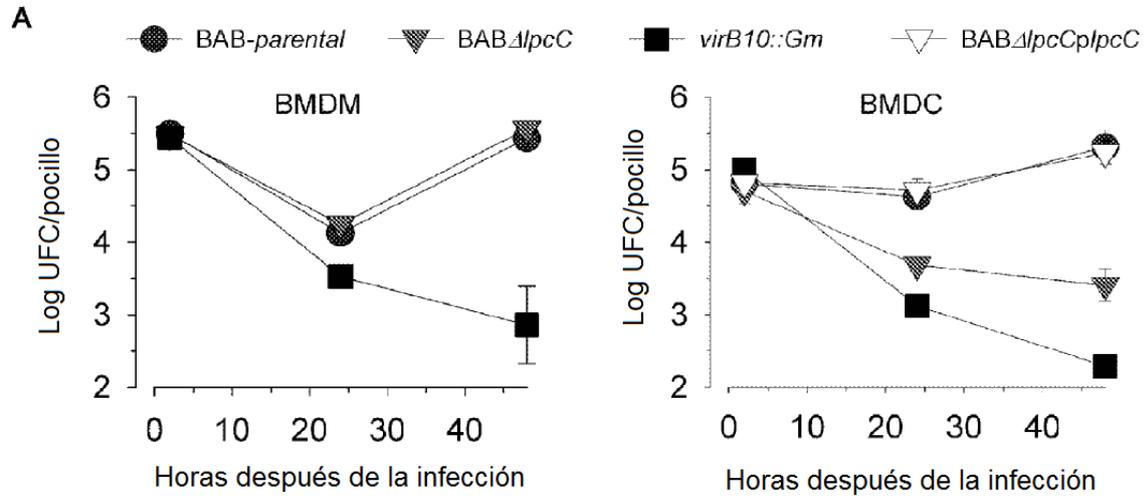


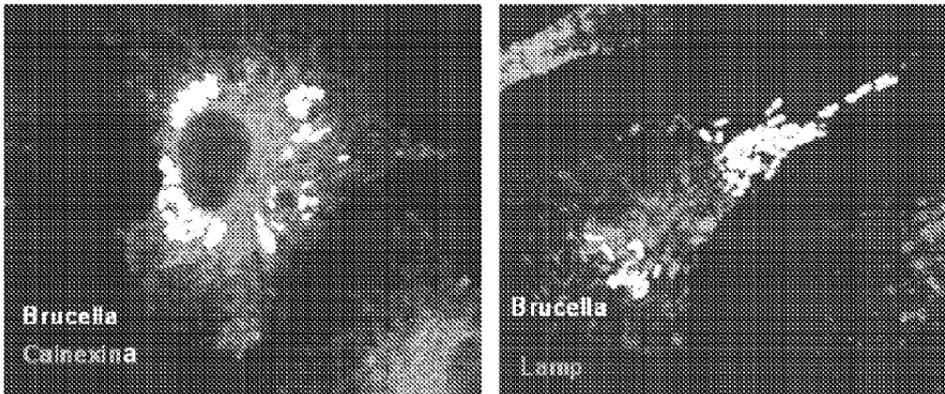
FIG. 3





B

BAB-parental



BAB- Δ lpcC

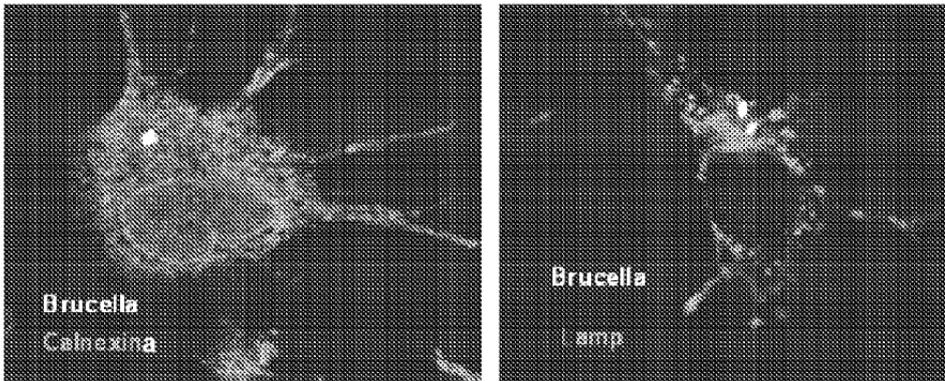


FIG. 5

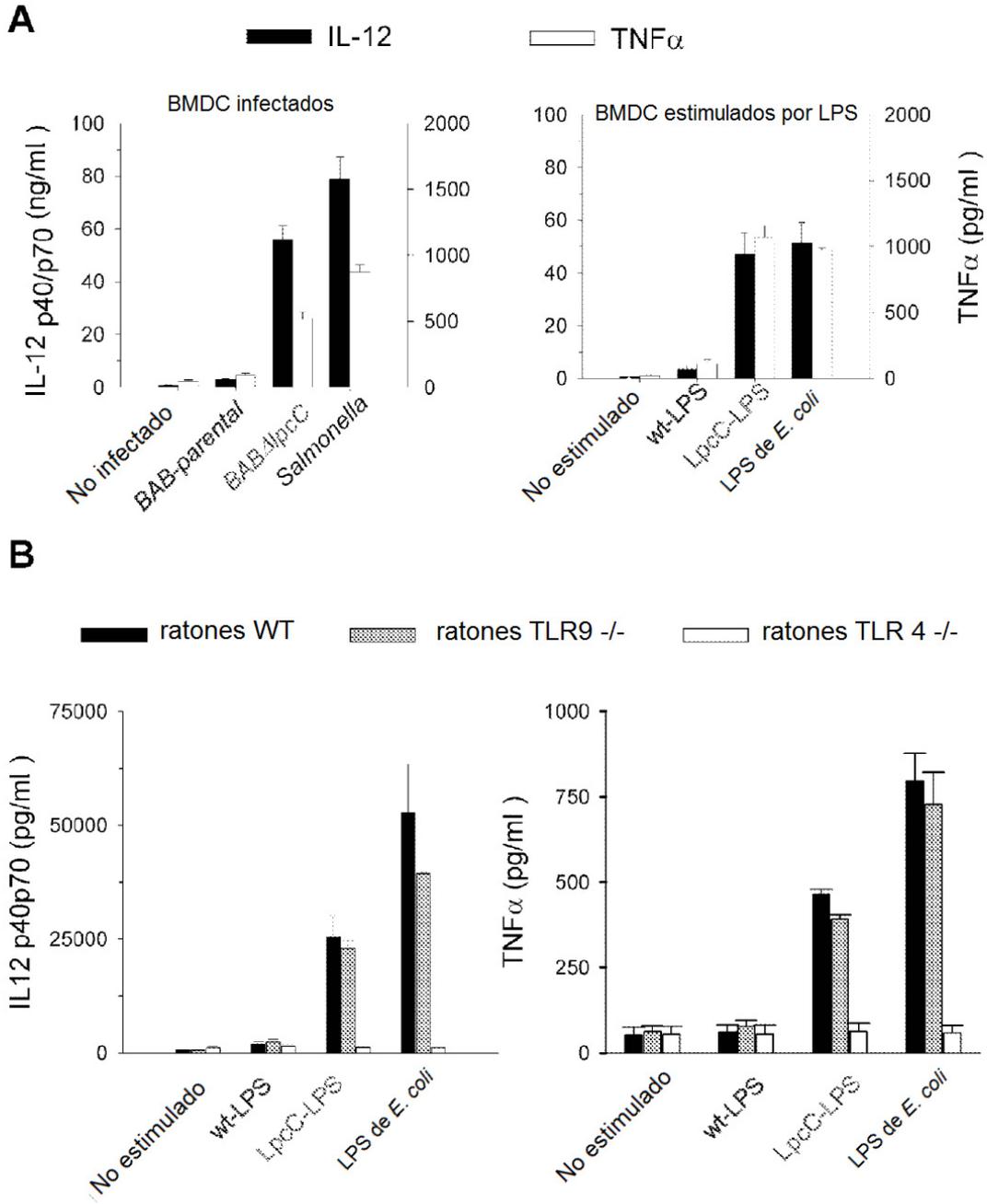


FIG. 6

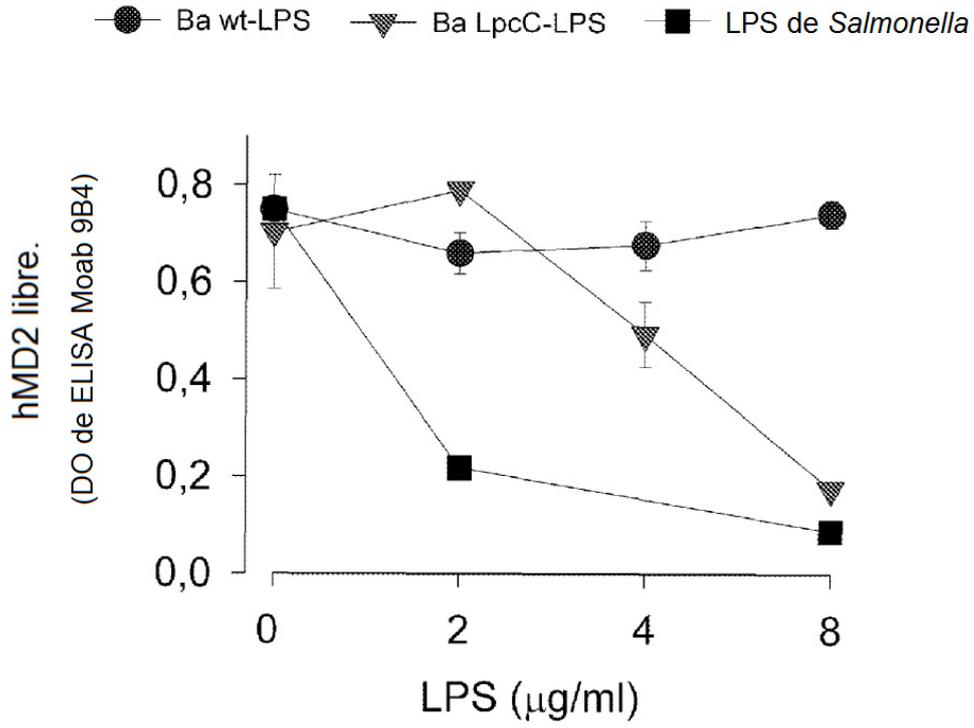


FIG. 7

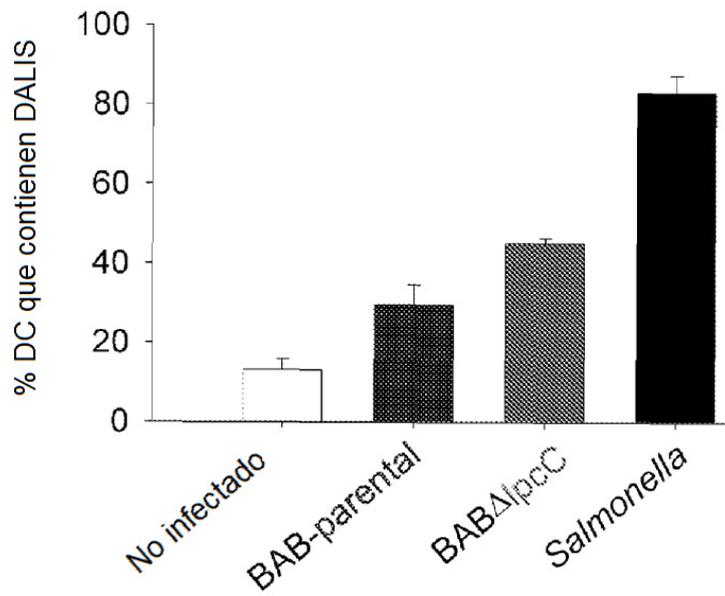


FIG. 8

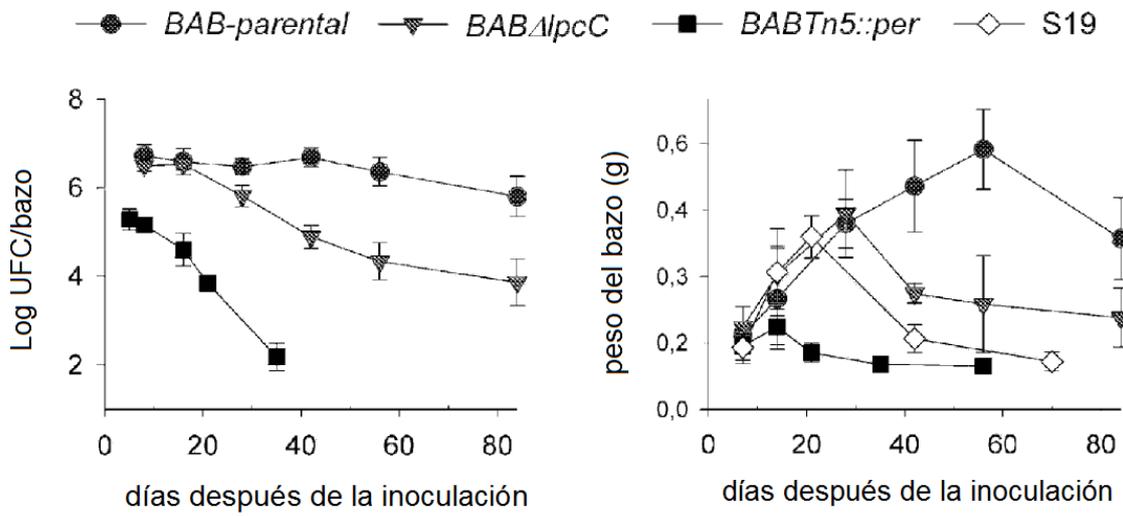


FIG. 9

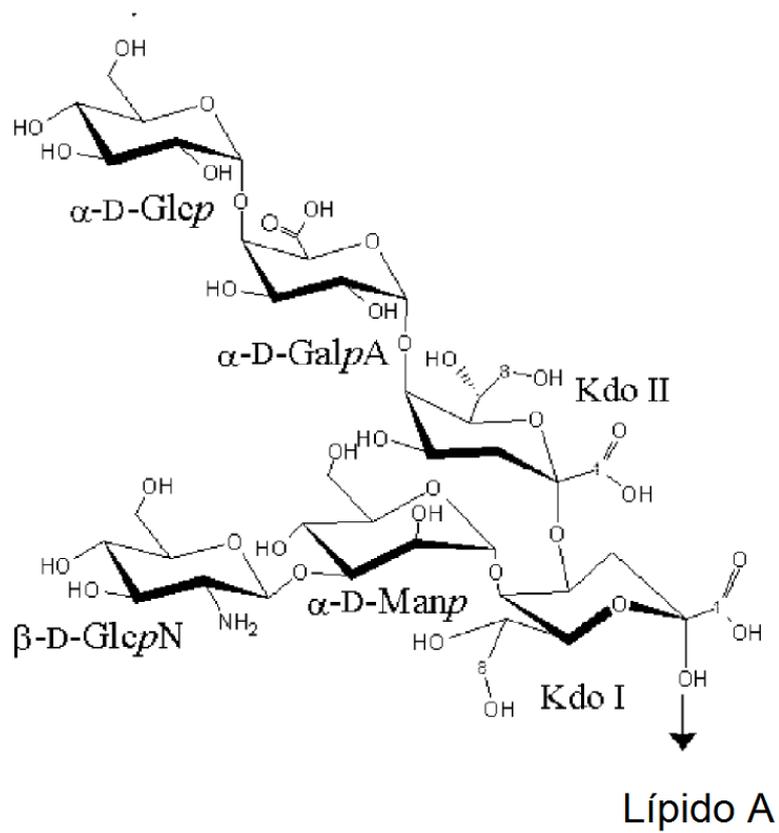


FIG. 10

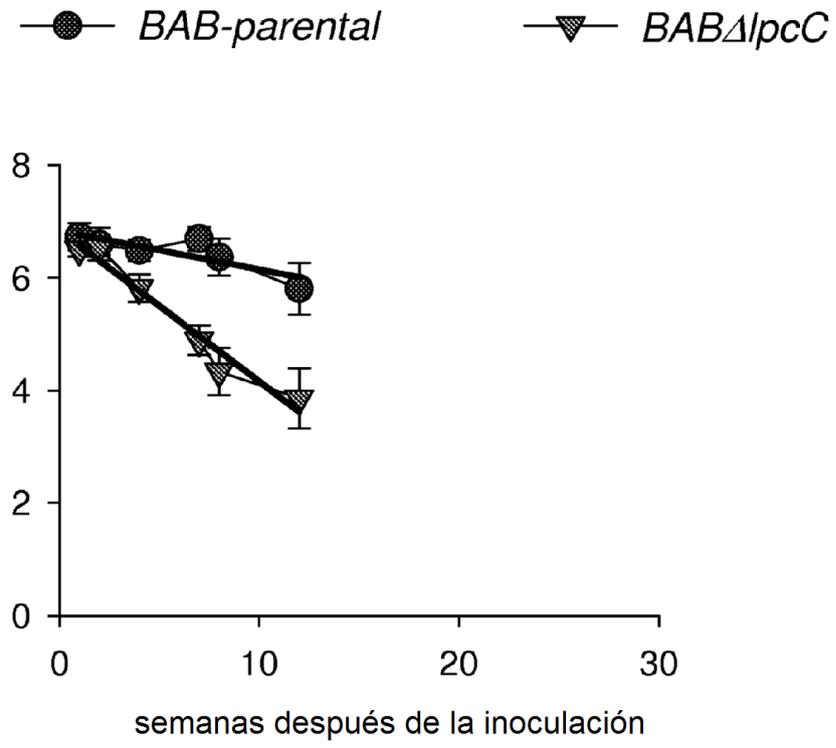


FIG. 11