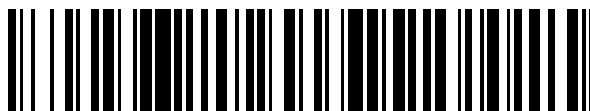


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 370**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2012 PCT/US2012/040910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2012 E 12726000 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2718722**

54 Título: **Método de detección diagnóstica basado en la proteómica para sinusitis crónica**

30 Prioridad:

06.06.2011 US 201161493829 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.01.2018

73 Titular/es:

NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL, INC.
(50.0%)

700 Children's Drive Room W172
Columbus, OH 43205, US y
THE OHIO STATE UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

DAS, SUBINOY y
BAKALETZ, LAUREN, O.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 649 370 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

Método de detección diagnóstica basado en la proteómica para sinusitis crónica

5 Campo de la invención

La invención proporciona un planteamiento proteómico para la identificación de perfiles proteicos bacterianos específicos que se pueden usar en el desarrollo de métodos para el diagnóstico de sinusitis crónica bacteriana. La invención proporciona métodos de determinación de la presencia de bacteria patógena en el tracto respiratorio superior de un sujeto usando perfiles proteicos de la bacteria patógena. La invención también proporciona métodos de diagnóstico de una infección bacteriana del tracto respiratorio superior de un sujeto usando perfiles proteicos de la bacteria patógena. Además, la invención proporciona dispositivos, inmunoensayos y kits para identificar bacterias patógenas en el tracto respiratorio superior.

15 Antecedentes

Otitis media, sinusitis, bronquitis, faringitis e infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS) no específicas representan aproximadamente el 75 % de las prescripciones de antibióticos a paciente externo en los Estados Unidos. El uso de antibiótico permanece alto a pesar del hecho de que más del 85 % de estas infecciones son debidas a virus y se resuelven sin complicación. Sin embargo, aquellas infecciones restantes que son de hecho debidas a patógenos bacterianos requieren tratamiento más eficaz que el que está actualmente disponible. Los cultivos bacterianos proporcionan valor diagnóstico limitado debido que las bacterias más comunes responsables de ITRS son también con frecuencia organismos comensales en la nasofaringe.

Las infecciones de las vías respiratorias superiores son el número uno de la razón para las visitas al consultorio en los EE.UU. (*American Academy of Pediatrics. Pediatrics*, 2004. 113:1.451-1.456, página web del "Center for Disease Control and Prevention", Gonzales R., y col. *JAMA*, 1997. 278(11):901-904, Nyquist A-C. *JAMA*, 1998. 279(11):875-877). Aproximadamente el 52 % de los pacientes adultos y el 45 % de los pacientes de pediatría se les prescribe antibióticos cuando son diagnosticados de una infección de vías respiratorias (Gonzales R., y col. *JAMA*, 1997. 278(11):901-904, Nyquist A-C. *JAMA*, 1998. 279(11): 875-877). Las infecciones de las vías respiratorias superiores son enfermedades multifactoriales y polimicrobianas. La infección por virus respiratorios (por ejemplo, VSR, adenovirus, rinovirus, virus parainfluenza) predispone a superinfección bacteriana por miembros de la flora normal de la nasofaringe: *Haemophilus influenzae* no tipificable, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*. Aunque las infecciones víricas son con frecuencia autolimitantes, el retraso terapéutico de la enfermedad bacteriana puede conducir a complicaciones, secuelas permanentes y morbilidad y mortalidad grave.

El diagnóstico principalmente se basa en manifestaciones clínicas. Las señales y los síntomas de enfermedad de etiologías bacterianas y no bacterianas con frecuencia son indistinguibles. La identificación bacteriana específica por técnicas de cultivo microbiológico tradicionales con frecuencia falla en detectar microorganismos que crecen dentro de biopelículas. La contaminación de especímenes por flora colonizadora residente con frecuencia da como resultado informes de cultivo en laboratorio de valor clínico incierto. Son necesarios otros métodos de detección.

Villaseñor-Sierra y Santos (*Clinical Infectious Diseases* 1999; 28:267-73) investigaron la presencia de subtipos de HiNT no tipificable mediante la determinación de los perfiles proteicos de membrana externa a partir de cultivos simultáneos de exudados nasofaríngeos y fluidos del oído medio de niños con otitis media aguda.

Krasan y col. (*Infection and Immunity* 1999 enero; 67(1):449-54) evaluaron la expresión de hia, y pili de hemaglutinación (HMW1 y HMW2) en aislados nasofaríngeos y de oído medio enfrentados de HiNT no tipificable de niños con otitis media aguda y determinaron que la mayoría de los aislados de HiNT no tipificable asociados con otitis media aguda expresan proteínas similares a HMW1/HMW2.

El uso antibiótico indiscriminado modifica la flora comensal en la nasofaringe e induce la selección y la aparición de microorganismos resistentes a anticuerpos comunes. A pesar de una tendencia descendente en la prescripción antibiótica en los últimos años, terapias antibióticas innecesarias e inapropiadas son comunes, particularmente en el tratamiento de otitis media y sinusitis.

La infección del tracto respiratorio superior continúa como una causa principal del uso excesivo de antibióticos y, por lo tanto, un contribuidor principal a la aparición extendida de resistencia a antibiótico. Por lo tanto, hay una necesidad de ensayos diagnósticos tempranos y rápidos que podrían discriminar entre bacterias comensales y patógenas. Estos ensayos promoverían el uso juicioso de terapia antibiótica, promoverían la elección más eficaz de tratamiento y mejorarían los resultados.

Compendio de la invención

Debido a las características de crecimiento únicas, las biopelículas bacterianas producen un conjunto distinto de proteínas que se pueden usar para distinguir entre estados comensales y patógenos. En el presente documento se

describen métodos de identificación del perfil proteico de biopelículas bacterianas. La metodología implica detectar cantidades trazas de proteínas distintivo (*signature*) que identifican patógenos bacterianos específicos de sitios normalmente estériles en las cavidades de los senos paranasales. Como se describe en el presente documento, las biopelículas producidas por *Haemophilus influenzae* (HiNT) no tipificable durante 10 días generan un perfil proteico específico. Las biopelículas formadas por HiNT *in vitro* liberan un conjunto distintivo de proteínas dentro de su ambiente que continúa identificable durante varios días. Proteínas de la membrana externa (OMP) son componentes predominantes del sobrenadante de biopelícula de HiNT. De particular interés son las OMP principal asociadas con virulencia bacteriana: proteína de membrana externa P5 (OMP P5) y proteína de membrana externa P2 (OMP P2). OMP adicionales incluyen adhesina de alto peso molecular 1/adhesina de alto peso molecular 2 (HMW1/HMW2), y IgA-proteasa. HMW1/HMW2, OMP P5 son mediadores de adhesión a células epiteliales, OMP P2 es una porina y la IgA proteasa funciona para escindir IgA del hospedador.

Estos estudios soportan el desarrollo de un ensayo y dispositivo de diagnóstico clínico para la identificación temprana y rápida de ITRS asociadas a HiNT, conduciendo a una elección más eficaz de tratamiento y resultados mejorados. HiNT se usó como un ejemplo para el estudio, pero los mismos métodos se pueden usar para identificar la presencia de cualquier bacteria patógena incluyendo aquellas conocidas por causar sinusitis crónica tales como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

En el presente documento también describimos un dispositivo de inmunoensayo que implica obtener una muestra de las secreciones dentro de las cavidades de los senos paranasales normalmente estériles, y detectar rápidamente la presencia de cantidades trazas de proteínas distintivo que identifican patógenos bacterianos específicos de estos sitios normalmente estériles.

En el presente documento se describen métodos de detección de la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende las etapas de: a) obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto; b) generar un perfil proteico de la muestra; c) comparar el perfil proteico con un perfil proteico de referencia, en donde el perfil proteico de referencia identifica una bacteria patógena; y d) determinar si el perfil proteico de la muestra se asocia con el perfil proteico de referencia, en donde la asociación es indicio de la presencia de la bacterias patógenas en el tracto respiratorio superior del sujeto.

En el presente documento también describimos métodos de detección de la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior de un sujeto como se describió anteriormente en donde el método comprende además la etapa de administración de un compuesto terapéutico para reducir o eliminar la bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto. Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo que reducen o eliminan la bacteria patógena en el tracto respiratorio superior incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpato líticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodiladores beta agonista, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona y sales de zinc.

En el presente documento también describimos métodos de detección de la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior de un sujeto como se describió anteriormente en donde el método comprende además la etapa de informar al sujeto de la presencia o ausencia de la bacteria patógena en el tracto respiratorio superior.

En el presente documento también describimos métodos de detección de la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior de un sujeto como se describió anteriormente en donde el método comprende además la etapa de diagnosticar el sujeto con una infección bacteriana, en donde la presencia de la bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto es indicio de una infección bacteriana.

El término "bacteria patógena" se refiere a cualquier bacteria que causa enfermedad. El término "bacteria comensal" se refiere a bacterias inocuas o que no causan enfermedad. Los métodos descritos en el presente documento también se pueden usar para distinguir la presencia de bacterias comensales frente a bacterias patógenas en el tracto respiratorio superior de un sujeto.

En el presente documento describimos métodos de diagnóstico de una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende las etapas de: a) obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto; b) generar un perfil proteico de la muestra; c) comparar el perfil proteico de la muestra con un perfil proteico de referencia, en donde el perfil proteico de referencia identifica una bacteria patógena; y d) determinar si el perfil proteico de la muestra se asocia con el perfil proteico; en donde la asociación es indicio de una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior del sujeto.

En el presente documento también se describen métodos de diagnóstico de una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior de un sujeto como se describió anteriormente en donde el método comprende además la etapa de la etapa de informar al sujeto del diagnóstico de una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior.

5 Los métodos descritos en el presente documento también incluyen métodos de diagnóstico de una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior de un sujeto como se describió anteriormente en donde el método comprende además la etapa de administrar un compuesto terapéutico para tratar la infección bacteriana. Un tratamiento para una infección bacteriana reducirá o aliviará los síntomas causados por la bacteria patógena o eliminará la bacteria del sitio de infección. Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo que tratan una infección
10 bacteriana en el tracto respiratorio superior incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpato-líticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol,
15 Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budenosido, mometasona, triamcinolona y dexametasona y sales de zinc. El término "perfil proteico" se refiere a al menos una proteína que se identifica al menos parcialmente o se caracteriza de manera que se puede hacer un seguimiento de la presencia o ausencia de la proteína en cualquier muestra particular. El término "perfil proteico de referencia" se refiere a un perfil proteico generado para un control o muestra patrón conocida.

Un perfil proteico de una muestra se asocia con un perfil proteico de referencia cuando una o más de las proteínas en el perfil de referencia están presentes en el perfil de la muestra a una concentración que indica infección o patogenicidad de la bacteria. Para determinar si un perfil proteico de la muestra se asocia con un perfil proteico de
25 referencia, los perfiles se puntúan para predecir qué tan probable la masa de un fragmento que detectó es probablemente de la secuencia peptídica que se prevé que es, y cuanta cantidad del péptido hay en el sobrenadante. Se pueden usar programas informáticos que analizan datos de espectrometría de masa. Por ejemplo, se puede usar Mascot (Matrix Science, Boston, MA), que realiza análisis de datos de espectrometría de masas a través de una evaluación estadística de emparejamientos entre fragmentos peptídicos observados y proyectados en vez de la correlación cruzada para determinar si la muestra se asocia con un perfil proteico de referencia. Véase, por
30 ejemplo, *Electrophoresis*, 20(18) 3551-67 (1999).

Los métodos precedentes se pueden llevar a cabo para cualquier bacteria patógena que infecta el tracto respiratorio superior, incluyendo *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Stenotrophomonas maltophilia*.

En el presente documento describimos usos de un compuesto terapéutico para la preparación de un medicamento para reducir o eliminar la bacteria patógena en el tracto respiratorio superior de un sujeto o usos para tratar una
40 infección bacteriana en el tracto respiratorio superior de un sujeto, en donde el sujeto tiene un perfil proteico que se asocia con un perfil proteico de referencia, y en donde la asociación es indicio de la presencia de la bacteria patógena o infección bacteriana en el tracto respiratorio superior del sujeto sea determinada por cualquiera de los métodos precedentes de detección de la presencia de una bacteria patógena o diagnóstico de una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior de un sujeto.

45 En el presente documento también describimos composiciones terapéuticas para la reducción o eliminación de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior de un sujeto o para el tratamiento de una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior de un sujeto, en donde el sujeto tiene un perfil proteico que se asocia con un perfil proteico de referencia, y en donde la asociación es indicio de la presencia de la bacteria patógena o infección bacteriana en el tracto respiratorio superior del sujeto sea determinada por cualquiera de los métodos precedentes
50 de detección de la presencia de una bacteria patógena o diagnóstico de una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior de un sujeto.

Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo que tratan una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina,
55 cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpato-líticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budenosido, mometasona,
60 triamcinolona y dexametasona y sales de zinc.

En un aspecto de la invención, la invención proporciona métodos de detección de la presencia de bacterias *Haemophilus influenzae* (HiNT) no tipificable en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprenden las etapas de: a) obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto; b) detectar la presencia
65 de al menos un biomarcador en la muestra, en donde el biomarcador es OMP P5 o OMP P2 en donde la presencia de al menos un biomarcador indica la presencia de bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto. En

una realización, el método comprende detectar la presencia de OMP P2 y/o OMP P5 en la muestra, en donde la presencia de OMP P2 y/o OMP P5 indica la presencia de bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto.

5 En el presente documento también describimos métodos de detección de la presencia de bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto en donde el método comprende además la etapa de administrar un compuesto terapéutico para reducir o eliminar las bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto. Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo que reducen o eliminan las bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpato líticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budenosido, mometasona, triamcinolona y dexametasona y sales de zinc.

15 La invención también proporciona métodos de diagnóstico de una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende las etapas de: a) obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto, b) detectar la presencia de al menos un biomarcador en la muestra, en donde los biomarcadores se seleccionan de OMP P5 y OMP P2 en donde la presencia de al menos un biomarcador indica una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto. En una realización, el método comprende detectar la presencia de OMP P2 y/o OMP P5 en la muestra, en donde la presencia de OMP P2 y/o OMP P5 indica una infección bacteriana por HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto.

20 En el presente documento también describimos métodos de diagnóstico de una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto como se describió anteriormente en donde el método comprende además la etapa de informar al sujeto del diagnóstico de una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior.

25 En el presente documento describimos métodos de diagnóstico de infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto como se describió anteriormente en donde el método comprende además la etapa de administrar un compuesto terapéutico para tratar la infección por HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto.

30 Un tratamiento para una infección por HiNT reducirá o aliviará los síntomas causados por las bacterias HiNT o eliminar las bacterias HiNT del sitio de infección. Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo que tratan una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpato líticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budenosido, mometasona, triamcinolona y dexametasona y sales de zinc.

35 El término "tracto respiratorio superior" incluye la nariz o fosas nasales, cavidad nasal, boca, garganta (faringe), cavidad de los senos paranasales y órgano para la fonación (laringe). El sistema respiratorio se cubre con una membrana mucosa que secreta moco o fluido. Este moco y fluido secretado se denomina en el presente documento "secreciones". En cualquiera de los métodos precedentes, la muestra de secreciones se puede recoger de la cavidad de los senos paranasales que incluyen el meato medio o el infundíbulo del etmoides. La "cavidad de senos paranasales" se refiere a los senos frontales (en la frente), senos maxilares (detrás de los huesos de la mejilla), senos del etmoides (entre los ojos) y los senos esfenoides (detrás de los ojos).

40 En el presente documento describimos el uso de un compuesto terapéutico para la preparación de un medicamento para reducir o eliminar bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto o para tratar una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto, en donde la presencia de bacterias HiNT o una infección por HiNT se determina por la presencia de al menos un biomarcador seleccionado de OMP P2 y OMP P5 determinada por cualquiera de los métodos precedentes de detección de la presencia de una bacteria HiNT o diagnóstico de una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto método determinado por los métodos precedentes de detección de la presencia de bacterias HiNT o diagnóstico de una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto.

45 En el presente documento describimos una composición terapéutica para la reducción o eliminación de bacterias HiNT o para el tratamiento de infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto, en donde la presencia de bacterias HiNT o infección por HiNT se determina por cualquiera de los métodos precedentes de detección de la presencia de una bacteria HiNT o diagnóstico de una infección por HTHI en el tracto superior de un sujeto.

Cualquiera de los métodos precedentes, usos o composiciones terapéuticas se pueden llevar a cabo sobre un sujeto que padece de sinusitis crónica, o un sujeto que es propenso de sufrir de sinusitis aguda recurrente. Además, cualquiera de los métodos precedentes se puede llevar a cabo sobre un sujeto que padece de Otitis media, bronquitis, faringitis, e infecciones no específicas del tracto respiratorio superior.

5 Los métodos, usos o composiciones terapéuticas para tratar la sinusitis crónica o una infección bacteriana patógena del tracto respiratorio superior en un sujeto pueden comprender detectar una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto usando cualquiera de los métodos precedentes y administrar la dosis apropiada de un compuesto terapéutico conocido para tratar eficazmente la bacteria patógena particular detectada dentro del tracto respiratorio superior del sujeto. Un tratamiento para una sinusitis crónica o una infección bacteriana patógena reducirá o aliviará los síntomas causados por la bacteria patógena o eliminará la bacteria patógena del sitio de la infección. Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpatoríticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budenosido, mometasona, triamcinolona y dexametasona y sales de zinc.

20 Los métodos de tratamiento, usos y composiciones terapéuticas de sinusitis crónica de una infección bacteriana patógena del tracto respiratorio superior en un sujeto pueden comprender diagnosticar una infección bacteriana patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto usando cualquiera de los métodos precedentes y administrar la dosis apropiada de un compuesto terapéutico conocido para tratar eficazmente la bacteria patógena particular detectada dentro del tracto respiratorio superior del sujeto. Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpatoríticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budenosido, mometasona, triamcinolona y dexametasona y sales de zinc.

35 En cualquiera de los métodos precedentes, usos o composiciones terapéuticas de la invención, la muestra se puede recoger usando hisopos estériles, gasa estéril, lavado nasal, tubo de aspiración o un catéter balón.

Para la etapa de detección en cualquiera de los métodos precedentes de la invención, el biomarcador se puede detectar usando un anticuerpo monoclonal. Además, se puede usar un inmunoensayo para detectar el biomarcador de interés en cualquiera de los métodos precedentes de la invención.

40 En cualquiera de los métodos precedentes de la invención, la muestra se puede recoger con un dispositivo que comprende un sustrato que presenta anticuerpos específicos para los biomarcadores de interés, tales como un catéter balón en el que el sustrato se ensarta en el puerto de aspiración del catéter.

45 En el presente documento describimos inmunoensayos para detectar la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende las etapas de a) obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto usando un dispositivo que comprende anticuerpos específicos para al menos un biomarcador asociado con la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto; b) detectar la presencia de al menos un biomarcador asociado con la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto para generar un perfil proteico; c) comparar el perfil proteico con un perfil proteico de referencia, en donde el perfil proteico de referencia identifica una bacteria patógena; y d) determinar si el perfil proteico de la muestra se asocia con el perfil proteico de referencia, en donde la asociación es indicio de la presencia de la bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto.

55 El término "inmunoensayo" es un planteamiento de laboratorio para detectar directa o indirectamente proteína o péptido en fluido, por ejemplo, fluido biológico, mediante el uso de una reacción inmunológica entre un antígeno y un anticuerpo.

60 El término "anticuerpo" es sinónimo a "inmunoglobulina", e incluye anticuerpos humanos de origen natural, anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo" quiere decir que incluye tanto el anticuerpo nativo como derivados de anticuerpos biológicamente activos y sintéticos, tales como, por ejemplo, Fab', F(ab')₂ o Fv así como anticuerpos de dominio único y cadena sencilla. Un derivado biológicamente activo de un anticuerpo conserva la capacidad de unirse a un antígeno. En particular, la invención proporciona métodos e inmunoensayos que usan anticuerpos específicos para los biomarcadores de interés, tales como anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a biomarcadores de interés, por ejemplo, OMP P2 y OMP P5.

65

Además, los inmunoensayos anteriormente descritos pueden comprender además una etapa de diagnosticar al sujeto con una infección bacteriana en donde la presencia de la bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto es indicio de una infección bacteriana.

5 En el presente documento también describimos inmunoensayos que comprenden además la etapa de administración de un compuesto terapéutico en una cantidad eficaz para tratar la infección bacteriana. Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpato líticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budenosido, mometasona, triamcinolona y dexametasona y sales de zinc.

10
15 En cualquiera de los inmunoensayos precedentes, la bacteria patógena detectada puede ser *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Stenotrophomonas maltophilia*.

20 Se puede usar un compuesto terapéutico para la preparación de un medicamento para reducir o eliminar bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto o para tratar una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto, en donde la presencia de bacterias HiNT o infección por HiNT se determina por la presencia de al menos un biomarcador seleccionado de OMP P2 y OMP P5 determinada por cualquiera de los métodos precedentes.

25 Se puede usar una composición terapéutica para la reducción o eliminación de bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto o para el tratamiento de infección por HiNT en las vías respiratorias de un sujeto, en donde la presencia de bacterias HiNT o infección por HiNT se determina por la presencia de al menos un biomarcador seleccionado de OMP P2 y OMP P5 determinada por cualquiera de los inmunoensayos precedentes.

30 En el presente documento describimos inmunoensayos para la detección de la presencia de una bacteria HiNT no tipificable en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende las etapas de a) obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto usando un dispositivo que comprende anticuerpos específicos para al menos un biomarcador asociado con la presencia de una bacteria HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto, en donde al menos un biomarcador es OMP P2 o OMP P5; b) detectar la presencia de al menos un biomarcador asociado con la presencia de una bacteria HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto para generar un perfil proteico; c) comparar el perfil proteico con un perfil proteico de referencia, en donde el perfil proteico de referencia identifica la bacteria HiNT; y d) determinar si el perfil proteico de la muestra se asocia con el perfil proteico de referencia, en donde la asociación es indicio de la presencia de la bacteria HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto.

40 En el presente documento describimos inmunoensayos para la detección de la presencia de bacteria HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto como se describió anteriormente que comprenden además una etapa de diagnosticar al sujeto con una infección por HiNT en donde la presencia de la bacteria HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto es indicio de una infección por HiNT.

45 En el presente documento también describimos inmunoensayos, los cuales además comprenden la etapa de administración de un compuesto terapéutico en una cantidad eficaz para tratar la infección bacteriana. Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpato líticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budenosido, mometasona, triamcinolona y dexametasona y sales de zinc.

55 En el presente documento describimos inmunoensayos para diagnosticar una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprenden las etapas de a) obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto usando un dispositivo que comprende anticuerpos específicos para al menos un biomarcador asociado con la presencia de un HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto, en donde el al menos un biomarcador es OMP P2 o OMP P5; b) detectar la presencia de al menos un biomarcador asociado con la presencia de una HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto para generar un perfil proteico; c) comparar el perfil proteico con un perfil proteico de referencia, en donde el perfil proteico de referencia identifica HiNT; y d) determinar si el perfil proteico de la muestra se asocia con el perfil proteico de referencia, en donde la asociación es indicio de una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto.

65

En el presente documento también describimos inmunoensayos que comprenden además la etapa de informar al sujeto de la presencia de una bacteria HiNT o una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto.

5 Compuestos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen antibióticos tales como penicilina, eritromicina, amoxicilina, timetoprim-sulfametoxazol, doxicilina, cefpodoxima, cefuroxima, cefdinir, claritromicina, azitromicina, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, agonistas alfa adrenérgicos tales como clorhidrato de oximetazolina, agentes anticolinérgicos (parasimpáticos) tales como bromuro de ipratropio, antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, broncodilatadores beta agonistas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, alcanfor, mentol, Echinacea, estabilizadores de mastocitos tales como cromolín sodio, esteroides nasales tópicos tales como propionato de fluticasona, budesonido, mometasona, triamcinolona y dexametasona y sales de zinc.

Además, la muestra usada en cualquiera de los inmunoensayos precedentes se puede obtener usando un hisopo estéril, gasa estéril, tubo de aspiración o un catéter balón.

15 En otro aspecto, en el presente documento, describimos un dispositivo para obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende un sustrato que presenta anticuerpos específicos para al menos un biomarcador asociado con la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto.

20 En el presente documento también describimos dispositivos para llevar a cabo cualquiera de los métodos precedentes de la invención o cualquiera de los inmunoensayos precedentes de la invención que se usan para obtener una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende un sustrato que presenta anticuerpos específicos para biomarcadores asociados con la presencia de una bacteria patógena en el tracto respiratorio superior del sujeto.

25 En cualquiera de los dispositivos precedentes, los anticuerpos pueden ser específicos para OMP P2 o OMP P5, tales como anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a OMP P2 de HiNT o anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a OMP P5 de HiNT.

30 En el presente documento se describen kits para llevar a cabo cualquiera de los métodos precedentes o inmunoensayos. Los kits pueden comprender un sustrato que presenta anticuerpos específicos para al menos un biomarcador asociado con la presencia de una bacteria patógena o una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior del sujeto. Los kits pueden comprender dispositivos para obtener la muestra de los compartimentos estériles dentro del tracto respiratorio superior del sujeto y generar un perfil proteico asociado con una bacteria patógena o infección bacteriana en el tracto respiratorio superior del sujeto. Los kits también pueden comprender anticuerpos que se unen específicamente a los biomarcadores de proteína de interés y componentes para inmunoensayos para detectar los biomarcadores de proteína usando estos anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 representa una tinción con plata del claro perfil proteico mantenido con el paso del tiempo en el sobrenadante de biopelícula de HiNT.

45 La Figura 2 representa un análisis de transferencia Western (*Western blot*) que verifica la presencia de las OMP de HiNT en sobrenadante de biopelícula de HiNT.

La Figura 3 representa un análisis de transferencia Western que verifica la presencia de OMP P2 y OMP P5 en el sobrenadante de biopelícula de diversas cepas de HiNT.

50 Descripción detallada

En el presente documento describimos métodos con sensibilidad y especificidad mejorada para detectar y diagnosticar sinusitis bacteriana. En particular, los métodos comprenden la detección bacteriana basada en anticuerpo de proteínas dentro de secreciones de la biopelícula patógena localizada dentro de las cavidades de los senos paranasales. Estos métodos permiten la detección de cantidades trazas de proteínas distintivo que identifican patógenos bacterianos específicos de sitios normalmente estériles en las cavidades de los senos paranasales. Los métodos evitan anticuerpos empíricos de amplio espectro que con frecuencia se dan inapropiadamente para tratar infecciones respiratorias víricas superiores debido a la dificultad de diagnosticar sinusitis bacteriana con una alta sensibilidad y alta especificidad. Los métodos son una mejora sobre cultivos bacterianos normales debido a que estos cultivos tienen muy baja sensibilidad para detectar biopelículas bacterianas y baja especificidad para distinguir entre organismos comensales y patógenos.

65 En el presente documento describimos un dispositivo que implica el suministro de un cable a través de un catéter balón a las cavidades de los senos paranasales normalmente estériles, muestreando mocos de estos sitios, y detectando rápidamente la presencia de cantidades trazas de proteínas distintivo que identifican patógenos bacterianos específicos de estos sitios normalmente estériles. Tras obtener la muestra, se puede realizar un

inmunoensayo para generar un perfil proteico que se compara con un perfil proteico de referencia generado por la bacteria patógena conocida por causar sinusitis crónica o una infección del tracto respiratorio superior.

Biomarcadores

5 El término "biomarcador" se refiere a una molécula de origen natural, gen, o característica por lo cual un proceso patológico o fisiológico particular o enfermedad se puede identificar o caracterizar. El término "biomarcador" se puede referir a una proteína medida en la muestra cuya concentración refleja la gravedad o presencia de alguna enfermedad. Los biomarcadores se pueden medir para identificar el riesgo de, diagnóstico de o progresión de un
10 proceso patológico o fisiológico o enfermedad. Biomarcadores a modo de ejemplo incluyen proteínas, hormonas, prohormonas, lípidos, carbohidratos, ADN, ARN y combinaciones de los mismos.

15 Por ejemplo, los biomarcadores para bacterias patógenas HiNT incluyen proteína de membrana exterior P2 (OMP P2; SEQ ID NO: 1), adhesina de alto peso molecular 1 (HMW1A; SEQ ID NO: 2), proteínas de unión a hierro quelado periplásmica putativa (SEQ ID NO: 3), endopeptidasa de serina específica a IgA (SEQ ID NO: 4), proteína de membrana exterior P5 (OMP P5; SEQ ID NO: 5), galactosa-1-fosfato uridililtransferasa (SEQ ID NO: 6), HMWA (SEQ ID NO: 7), proteína de unión a fosfato transportador ABC de fosfato (SEQ ID NO: 8), precursor de adhesina B putativo FimA (SEQ ID NO: 9), adhesina de alto peso molecular 2 (HMW2A; SEQ ID NO: 10), precursor de la proteína de membrana exterior P5 (SEQ ID NO: 11) y proteína de membrana exterior P1 (OMP P1; SEQ ID NO: 12).

20 Los métodos pueden incluir detectar al menos un biomarcador, al menos dos biomarcadores, al menos tres biomarcadores, al menos cuatro biomarcadores, al menos cinco biomarcadores o seis o más biomarcadores del perfil proteico de una bacteria patógena. La detección de los biomarcadores de proteína incluye detectar la longitud completa o fragmentos de los biomarcadores de proteína, incluyendo fragmentos inmunógenos o biológicamente
25 activos. Los métodos pueden incluir detectar al menos OMP P2 y OMP P5 para generar un perfil proteico de bacteria HiNT.

30 En el presente documento se describe variantes biológicamente activas o inmunológicamente activas de las secuencias de aminoácidos de la presente invención; y "considerables equivalentes" de las mismas (por ejemplo, con al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, normalmente al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, más normalmente al menos aproximadamente 98 %, o lo más normalmente al menos aproximadamente 99 % de
35 identidad de aminoácidos) que conservan la actividad biológica y/o inmunológica. Los polipéptidos codificados por variantes alélicas pueden tener una actividad similar, incrementada o disminuida en comparación con polipéptidos codificados por los polinucleótidos nativos.

40 En el presente documento también describimos polipéptidos o péptidos aislados codificados por los fragmentos de ácidos nucleicos o por variantes degeneradas de los fragmentos de ácidos nucleicos. El término "variante degenerada" se refiere a fragmentos de nucleótidos que difieren de un fragmento de ácidos nucleicos nativo (por ejemplo, un ORF) por secuencia de nucleótidos pero, debido a la degeneración del código genético, codifican una secuencia polipeptídica idéntica. Fragmentos de ácidos nucleicos preferidos son los ORF que codifican proteínas.

45 Los polipéptidos pueden contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras que no afectan a la actividad biológica y/o inmunógena del polipéptido. Alternativamente, se contempla que los polipéptidos tienen sustituciones de aminoácidos conservadoras que pueden o no pueden alterar la actividad biológica. El término "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido nativo con un resto no nativo, incluyendo aminoácidos de origen natural y de no origen natural, de manera que hay poco o no efecto sobre la polaridad o carga del resto de aminoácido en esa posición. Por ejemplo, una sustitución
50 conservadora resulta del reemplazamiento de un resto no polar en un polipéptido con algún otro resto no polar.

Además, cualquier resto nativo en el polipéptido también puede estar sustituido con alanina, según los métodos de "mutagénesis por rastreo de alanina". Aminoácidos de origen natural se caracterizan basándose en sus cadenas laterales como sigue: básicos: arginina, lisina, histidina; ácidos: ácido glutámico, ácido aspártico; polares no cargados: glutamina, asparagina, serina, treonina, tirosina; y no polares: fenilalanina, triptófano, cisteína, glicina, alanina, valina, prolina, metionina, leucina, norleucina, isoleucina. Reglas generales para las sustituciones de aminoácidos se exponen en la Tabla 1 de a continuación.

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos

Restos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asn
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg

5

(continuación)

Restos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met,	Leu
Lys	Arg, 1,4 Diaminobutírico	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Arg
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala,	Leu

10 Los polipéptidos se pueden codificar por secuencias de nucleótidos que son básicamente equivalentes a los polinucleótidos que codifican los biomarcadores de polipéptido. Los polinucleótidos según la invención pueden tener, por ejemplo, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, más normalmente al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, e incluso más normalmente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia a las secuencias de polinucleótidos nativos.

15 Los fragmentos de secuencia de ácidos nucleicos pueden hibridar bajo condiciones estrictas con las secuencias de nucleótidos codificadoras de los biomarcadores de polipéptidos o complementos de los mismos, dicho fragmento es mayor de aproximadamente 5 nucleótidos, preferiblemente 7 nucleótidos, más preferiblemente mayor de 9 nucleótidos, y lo más preferiblemente mayor de 17 nucleótidos. Se contemplan fragmentos de, por ejemplo, 15, 17 o 20 nucleótidos o más que son selectivos para (es decir, específicamente hibridan con uno cualquiera de los polinucleótidos de la invención). Las sondas pueden ser capaces de hibridar específicamente con un polinucleótido que puede diferenciar secuencias de polinucleótidos de otras secuencias de polinucleótidos en la misma familia de genes o puede diferenciar genes de otros genes bacterianos, y se basan preferiblemente en secuencias de nucleótidos únicas.

25 El término "estricto" se usa para referirse a condiciones que se entienden comúnmente en la técnica como estrictas.

30 La severidad de la hibridación principalmente se determina por temperatura, fuerza iónica y la concentración de agentes de desnaturalización tales como formamida. Ejemplos de condiciones estrictas para la hibridación y el lavado son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 65 a 68 °C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50 % a 42 °C. Véase Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2.sup.nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). También se pueden usar condiciones más estrictas (tales como mayor temperatura, menor fuerza iónica, mayor formamida u otro agente de desnaturalización), sin embargo, la tasa de hibridación estará afectada. En casos en los que se tiene interés en la hibridación de desoxiligonucleótidos, las condiciones de hibridación estrictas a modo de ejemplo adicionales incluyen el lavado en 6xSSC pirofosfato de sodio al 0,05 % a 37 °C (para oligos de 14 bases), 48 °C (para oligos de 17 bases), 55 °C (para oligos de 20 bases), y 60 °C (para oligos de 23 bases).

40 Se pueden incluir otros agentes en la hibridación y los tampones de lavado con el fin de reducir la hibridación no específica y/o de fondo. Ejemplos son albúmina de suero bovina al 0,1 %, polivinil-pirrolidona al 0,1 %, pirofosfato de sodio al 0,1 %, dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, NaDodSO.sub.4 (SDS), ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a sonicación (u otro ADN no complementario), y sulfato de dextrano, aunque también se pueden usar otros agentes adecuados. La concentración y los tipos de estos aditivos se pueden cambiar sin afectar sustancialmente la severidad de las condiciones de hibridación. Los experimentos de hibridación generalmente se llevan a cabo a pH 6,8 a 7,4, sin embargo, a condiciones de fuerza iónica normales, la tasa de

hibridación es casi independiente del pH. Véase Anderson y col., "Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach", Cap. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra). Las condiciones de hibridación pueden ser ajustadas por un experto en la técnica para acomodar estas variables y permitir que los ADN de diferentes parentescos formen híbridos.

- 5 El uso para secuencias también puede incluir variaciones alélicas y de especie. Métodos de programa informático preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete informático GCG, que incluye GAP (Devereux y col., *Nucl. Acid. Res.*, 12:387, 1984; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y col., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990). El programa BLASTX está públicamente disponible a partir del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y col. NCB/NILM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul y col., supra). El algoritmo de Smith Waterman bien conocido también se puede usar para determinar la identidad.

Métodos de generación de perfiles proteicos

- 15 Los métodos de la invención implican generar un perfil proteico de muestras de secreción obtenidas del tracto respiratorio superior de un sujeto y generar perfiles proteicos de sobrenadantes de biopelícula de bacteria patógena. Los perfiles proteicos de biopelícula de bacteria patógena se pueden usar como perfiles proteicos de referencia para su uso en los métodos de la invención.

- 20 La separación de la proteína de interés de los otros miembros del perfil proteico se puede conseguir por cualquier número de técnicas, tales como centrifugación por gradiente de sacarosa, división acuosa u orgánica (por ejemplo, división en dos fases), electroforesis en gel de no desnaturalización, electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar, isotacoforesis, espectrometría de masas, cromatografía (por ejemplo, HPLC), electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, tal como SDS-PAGE), permeación en gel, columnas de centrifugación de intercambio iónico y similares. En estas realizaciones, SELDI, u otras técnicas de análisis rápido, se pueden usar para hacer el seguimiento del proceso de purificación. Después de la purificación, todos los biomarcadores potenciales se pueden caracterizar por SDS PAGE y espectrometría de masas e identificar por mapeado peptídico y/o análisis de secuencia de aminoácidos.

- 30 Por ejemplo, los biomarcadores de proteína se pueden separar por el método de separación por gradiente de tamaño o densidad flotante, tal como un gradiente de sacarosa discontinuo, que separa los polipéptidos componentes de la muestra por los tamaños de los complejos en los que participan. Los gradientes de sacarosa para la separación de proteínas son bien conocidos, y se pueden modificar si es necesario. Tales modificaciones pueden incluir el uso de un gradiente continuo, en vez de discontinuo, y diferentes condiciones de gradiente (por ejemplo, diferentes concentraciones de sacarosa o diferentes tampones). La longitud del gradiente también se puede variar, con gradientes mayores que se espera que den mejor separación total de las proteínas y complejos proteicos, y proporcionen un número mayor de fracciones que, a continuación, se analizan cada una individualmente usando un sistema de desnaturalización.

- 40 Los biomarcadores de proteína individuales se pueden separar por electroforesis basándose en el tamaño (por ejemplo, por SDS-PAGE o gel de determinación de tamaño). Otras técnicas de separación pueden incluir división en dos fases acuosas y separación por electroforesis en gel de agarosa de no desnaturalización. En otras realizaciones, la separación emplea el sistema de desnaturalización tal como un gel de enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar o isotacoforesis. Alternativamente o además, se pueden usar análisis electroforético bidimensional (por ejemplo, Wilkins y col., "Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics", Springer-Verlag, Berlín, 1997). Las proteínas se pueden visualizar sobre tales geles usando cualquiera de las diversas tinciones conocidas en la técnica (por ejemplo, azul de Tripiano o colorante SyproRuby). También se pueden usar sistemas tampón tradicionales para separar proteínas en los fraccionamientos del componente de los sistemas descritos. La temperatura, el voltaje y la intensidad de corriente a la cual se corren los geles individuales también se pueden modificar, como se puede la velocidad y la duración de la calibración del gradiente y la centrifugación.

La purificación de los biomarcadores de proteína se puede realizar usando técnicas cromatográficas tradicionales.

- 55 En una realización, se puede usar cromatografía líquida de alta presión (HPLC). También, se puede usar una combinación de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para purificar la proteína. A continuación, se analizan las fracciones para la proteína de interés usando SELDI u otros métodos.

- 60 Se puede usar una diversidad de métodos para generar el perfil proteico tal como cierta tecnología de Espectrometría de Masas de Desorción/Ionización por láser asistida por matriz (MALDI), Desorción/Ionización por láser aumentada en superficie (SELDI) y Espectrometría de Masas con Chip proteico.

- 65 Los métodos pueden incluir etapas para analizar el perfil proteico. En una realización, el análisis del perfil proteico comprende un análisis estadístico y otras técnicas de manipulación de datos (por ejemplo, procesamientos de señal, eliminación de ruido). En algunas realizaciones, técnicas para el análisis comprenden programa informático de

cálculo estadístico y procesamiento de datos. Por ejemplo, el análisis del perfil proteico puede comprender una determinación de al menos uno del peso molecular (masa), carga neta, y/o cantidad de las proteínas en la muestra.

El método también puede comprender la etapa de comparación del perfil proteico para la muestra del sujeto con un perfil proteico de referencia. Además de los perfiles proteicos de biopelícula generados para cepas conocidas de bacterias, el perfil de referencia puede ser de un sujeto control sano que no presenta síntomas de la enfermedad de interés (es decir, un control negativo). El perfil de referencia puede ser de un sujeto que tiene una enfermedad de interés (es decir, un control positivo). También, el perfil proteico de la muestra se puede comparar con un perfil proteico de referencia aislado del mismo sujeto, pero en un momento diferente (por ejemplo, para hacer un seguimiento de la progresión o remisión de la enfermedad). El perfil proteico de la muestra se puede comparar con una pluralidad de unos perfiles proteicos de referencia como, por ejemplo, perfiles de referencia generados como diagnóstico de una enfermedad particular o subtipo de enfermedad. De este modo, puede ser posible determinar si el perfil proteico de la muestra corresponde a una proteína particular o proteínas de interés que son típicas de una enfermedad cualquiera o subtipo de enfermedad.

Kits y dispositivos

Los kits se pueden usar para llevar a cabo los métodos e inmunoensayos de la invención. Los kits pueden comprender dispositivos para obtener la muestra de secreción de los compartimentos estériles dentro del tracto respiratorio superior del sujeto. Los kits también pueden comprender anticuerpos que se unen específicamente a los biomarcadores de proteína de interés y componentes para los inmunoensayos para detectar los biomarcadores de proteína usando estos anticuerpos. Además, los kits pueden comprender sustratos que presentan anticuerpos específicos para los biomarcadores de proteína de interés. Además, los kits pueden comprender instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos o inmunoensayos de la invención.

En una realización, las secreciones del tracto respiratorio superior se pueden obtener usando hisopos estériles o gasas. En otra realización de la invención, la muestra de secreción se puede recoger usando métodos de lavado nasales. Alternativamente, la muestra de secreción se puede recoger usando un tubo de aspiración unido a una bomba eléctrica y un catéter insertado en la nasofaringe del sujeto.

En otra realización, el dispositivo para obtener la muestra de secreción es una técnica de Seldinger con catéter balón modificada que permite la recogida de secreciones de los compartimentos estériles dentro del tracto respiratorio superior del sujeto. El catéter balón puede tener un sustrato que presenta anticuerpos específicos para los biomarcadores de proteína de interés ensartado en el catéter. Se puede usar una broncoesofagoscopia con chip distal modificada o esofagoscopia transnasal en la cual un sustrato que presenta anticuerpos específicos para los biomarcadores de proteína de interés está ensartado en el puerto de aspiración del dispositivo.

La invención proporciona un inmunoensayo para la detección del al menos un biomarcador en los métodos. Por ejemplo, anticuerpos específicos para dos o más biomarcadores dentro del perfil proteico se presentan o absorben a un sustrato sólido, y la muestra de secreción obtenida a partir de las vías respiratorias superiores del tracto respiratorio de un sujeto se pone en contacto con el sustrato sólido y se detecta la unión del anticuerpo al sustrato.

Cualquier tipo de sistema de inmunoensayo conocido en la técnica se puede usar para detectar los biomarcadores de los perfiles proteicos. Métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: radioinmunoensayos, ensayos ELISA, ensayos tipo sándwich, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis y algún otro método de generación de un perfil proteico descrito en el presente documento. Los inmunoensayos pueden ser un ensayo tipo sándwich en el que el analito diana (biomarcador de interés) está "intercalado" entre un anticuerpo marcado y un anticuerpo inmovilizado sobre el sustrato sólido. El inmunoensayo se lee observando la presencia y la cantidad de complejo de anticuerpo marcado a antígeno unido al anticuerpo inmovilizado. Otro inmunoensayo también puede ser un inmunoensayo tipo "competición", en el que un anticuerpo inmovilizado sobre una superficie sólida está en contacto con una muestra (por ejemplo, secreciones del tracto respiratorio superior) que contiene tanto una cantidad desconocida de analito antígeno (biomarcador de interés) como con antígeno marcado del mismo tipo. A continuación, se determina la cantidad de antígeno marcado unido sobre el sustrato sólido para proporcionar una medida indirecta de la cantidad de analito antígeno (biomarcador de interés) en la muestra. Tales inmunoensayos se realizan fácilmente en una "tira reactiva" u otro formato de dispositivo de ensayo (por ejemplo, través de flujo o una tira reactiva por migración u otro diseño de dispositivo de ensayo) para uso conveniente. Por ejemplo, numerosos tipos de ensayos inmunoensayos con tira reactiva se describen en el documento de Patente americana N.º 5.656.448.

Los inmunoensayos se pueden llevar a cabo sobre láminas, por ejemplo, tiras o láminas de nitrocelulosa o difloruro de polivinilideno (PVDH) u otras membranas, tira reactiva, pocillos, por ejemplo, placas de plástico de 96 pocillos, o en tubos.

Un dispositivo usado en los métodos e inmunoensayos de la invención pueden, por ejemplo, proporcionar un indicio de color cuando el biomarcador de interés está dentro de la muestra de secreción del tracto respiratorio superior de un sujeto. El dispositivo se podría usar en un ajuste clínico para determinar rápidamente si un sujeto tiene una bacteria patológica o una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior. Alternativamente, los métodos e inmunoensayos de la presente invención se pueden usar en combinación con un densitómetro o generalmente un dispositivo para medir la intensidad de la luz, la transmitancia, el reflejo o refracción, o para medir la longitud de onda de la luz como una medida del resultado del ensayo. El densitómetro u otro dispositivo pueden proporcionar medida rápida de la densidad óptica del sustrato dentro del dispositivo que se ha puesto en contacto con la muestra de secreciones. En una realización, un cambio de color, densidad, u otro parámetro se puede leer a simple vista.

La invención también se puede llevar a cabo usando un inmunoensayo de flujo lateral que contiene un dispositivo dentro del ensayo para extraer la muestra para análisis, y anticuerpos específicos para las proteínas dentro del perfil proteico de una bacteria patógena de interés. Un dispositivo de inmunoensayo, por ejemplo, tal como los descritos en el documento de Patente americana N.º 5.415.994 y 5.763.262, puede comprender un perfil proteico identificado para una bacteria patógena particular usando cualquiera de los métodos de la invención. En particular, la invención proporciona inmunoensayos colorimétricos que permiten la detección visual de los biomarcadores de interés dentro de la muestra de secreción. La detección visual permite un resultado rápido que se puede incorporar dentro de un plan de tratamiento para la infección.

Se puede usar un perfil proteico de referencia o patrón en los métodos de la invención para comparar el perfil proteico de la muestra generado por los métodos, inmunoensayos o kits de la invención. El perfil proteico de referencia o patrón proporciona la concentración de un biomarcador conocido por estar presente en la secreción de biopelícula de una bacteria patógena dentro del tracto respiratorio superior durante una infección. Un "calibrador" se refiere a inmunoensayos que detectan cantidades conocidas de biomarcadores de interés para generar una curva de calibración para cuantificar la concentración del biomarcador en un fluido biológico desconocido.

El término "patrón" o "de referencia" se refiere a inmunoensayos que miden biomarcadores de interés de fluidos biológicos conocidos por ser recogidos de un sujeto que tiene una infección bacteriana del tracto respiratorio superior en una forma cuantitativa adecuada para controlar la calidad de reactivos contenidos en un kit de inmunoensayo de la presente invención. Otros aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán tras la consideración de los siguientes ejemplos ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Determinación del perfil de proteína distintivo para bacterias patógenas

Se analizaron sobrenadantes de biopelícula de *H. influenzae* (HiNT) no tipificable para determinar el perfil de proteína distintivo de HiNT. La cepa de HiNT 86-028NP se cultivó en portaobjetos de cámara de ocho pocillos durante 10 días y los sobrenadantes resultantes se recogieron a intervalos de 24 horas. Se separaron las proteínas en los sobrenadantes recogidos de cultivos de biopelícula de HiNT por SDS-PAGE y la tinción con plata reveló un perfil proteico claro mantenido con el paso del tiempo como se muestra en la Figura 1.

Se analizaron las proteínas aisladas de sobrenadantes de biopelícula de HiNT por nano cromatografía líquida/espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS). Los pesos moleculares de las proteínas identificadas se compararon con los pesos moleculares del perfil proteico conocido para la cepa de HiNT 86-028NP ((Bakaletz y col. *Infection and Immunity*, 56(2):331-335, 1988), y se puntuaron las proteínas identificadas basándose en su asociación con el perfil proteico 86-028NP usando Mascot (Matrix Science, Boston MA) según las instrucciones del fabricante. Los resultados de esta comparación se exponen en la Tabla 2 de a continuación. Se identificaron varias proteínas de membrana externa de HiNT (OMP) (en negrita), con predominancia de OMP principales (cursiva en negrita): adhesinas de alto peso molecular 1 y 2 (HMW1/HMW2), OMP P5, OMP P2, OMP P1, y IgA-proteasa.

Para verificar la presencia de las OMP de HiNT en sobrenadantes de biopelícula de HiNT, se llevó a cabo el análisis de transferencia Western con antisuero frente a OMP totales, OMP P5 y OMP P2 (anticuerpos policlonales de chinchilla), así como proteínas HMW1 y HMW2 (anticuerpos monoclonales). Este análisis verificó la presencia de OMP específicas a HiNT múltiples en sobrenadantes de biopelícula (véase la Figura 2).

Tabla 2

PROTEÍNA IDENTIFICADA	Puntuación	Masa (kDa)	Nº de acceso	SEQ ID NO:
<i>Proteína de membrana exterior P2</i>	1227	39,9	<i>gi 68248747</i>	1
<i>HMW1A</i> , adhesina de alto peso molecular 1	1205	154,5	<i>gi 68250281</i>	2
Proteína de unión a hierro quelado periplásmica putativa	1089	32,4	<i>gi 301169065</i>	3
<i>Endopeptidasa de serina específica a IgA</i>	948	197,5	<i>gi 68249575</i>	4
<i>Proteína de membrana exterior P5</i>	886	38,4	<i>gi 68249712</i>	5
Galactosa-1-fosfato uridililtransferasa	791	34,0	<i>gi 145640927</i>	6
<i>HMWA</i>	720	160,5	<i>gi 68249817</i>	7
Proteína de unión a fosfato transportador ABC de fosfato	703	36,6	<i>gi 16273649</i>	8
Precursor de adhesina B putativo FimA	402	35,0	<i>gi 3003012</i>	9
<i>HMW2A</i> , adhesina de alto peso molecular 2	326	160,7	<i>gi 68249817</i>	10
<i>HMWA</i>	321	160,5	<i>gi 5929966</i>	11
<i>Proteína de membrana externa P5</i> ; Precursor	283	37,7	<i>gi 585614</i>	12
<i>Proteína de membrana externa P1</i>	215	49,7	<i>gi 9716607</i>	13

Un ejemplo de un perfil de proteína distintivo de la biopelícula de HiNT patógena es OMP P5, OMP P2, HMW1 y HMW2. Por lo tanto, la detección de estos biomarcadores de proteína en una muestra de secreción obtenida del tracto respiratorio superior es indicio de infección por HiNT. El diagnóstico preciso de infección bacteriana patógena, tal como infección por HiNT, en pacientes con infección de las vías respiratorias superiores facilitará la selección de la terapia apropiada y promoverá prescripción juiciosa de anticuerpos para conseguir una recuperación temprana en pacientes y para reducir la aparición de infecciones resistentes a antibiótico en la comunidad.

Ejemplo 2

Detección de proteínas específicas a biopelícula de HiNT en infección de los senos paranasales

Para determinar el perfil proteico de un paciente humano que padece de sinusitis, se obtienen muestras de secreción del tracto respiratorio superior de los pacientes. Estas muestras se analizaron como se describe en el Ejemplo 1 para la presencia de OMP P5, OMP P2, HMW1 y HMW2. El perfil proteico de los pacientes se compara con el perfil proteico de referencia generado de los sobrenadantes de biopelículas de HiNT *in vitro* como se describió anteriormente.

Ejemplo 3

Identificación de biomarcadores de proteína asociados con otras especies de bacterias

Los métodos descritos en el Ejemplo 1 se llevan a cabo con los sobrenadantes de biopelículas de otras especies bacterianas patógenas tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*.

Ejemplo 4

Análisis adicional de la determinación del perfil de proteína distintivo para bacterias patógenas

Se analizaron sobrenadantes de biopelícula obtenida de cepas múltiples de *H. influenzae* (HiNT) no tipificable para definir el perfil de proteína distintivo de HiNT. Las cepas de HiNT 86-028NP 1128MEE, 1714, 1748, 1885MEE y 2019 se cultivaron en portaobjetos de cámara de ocho pocillos durante 10 días y los sobrenadantes resultantes se recogieron a intervalos de 24 horas. Se separaron las proteínas en los sobrenadantes recogidos de cultivos de biopelícula de HiNT por SDS-PAGE y la tinción con plata reveló un perfil proteico claro mantenido con el paso del tiempo. La Figura 3 representa una transferencia Western que usa anticuerpos anti-OMP P2 o anti-OMP P5 de chinchilla, que demuestra que OMP P2 y OMP P5 están presentes en altos niveles en las biopelículas de todas las cepas de HiNT ensayadas.

Se analizaron las proteínas aisladas de sobrenadantes de biopelícula de HiNT por nano cromatografía líquida/espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS). Los pesos moleculares de las proteínas identificadas se compararon con los pesos moleculares del perfil proteico conocido para la cepa de HiNT 86-028NP ((Bakaletz y col. *Infection and Immunity*, 56(2):331-335, 1988), y las proteínas identificadas se puntuaron basándose en su asociación con el perfil proteico 86-028NP usando Mascot (Matrix Science, Boston MA) según las instrucciones del fabricante. Los resultados de esta comparación se exponen en la Tabla 3 de a continuación. Estos estudios demuestran que un perfil proteico de biopelícula de HiNT preferido comprende OMP P2 y OMP P5

Tabla 3

Fragmento P2		
Puntuación	Descripción	Organismo
2927	Proteína de membrana externa P2	<i>H. influenzae</i>
771	Proteína de membrana externa P5	<i>H. influenzae</i>
688	Proteína 1 periplásmica de unión a espermidina/putrescina	<i>H. influenzae</i>
352	Queratina, tipo II citoesqueleto 2 epidérmica	<i>Homo sapiens</i>
335	Tripsina	<i>Sus scrofa</i>
292	Homólogo proteína mrp	<i>H. influenzae</i>
165	3-deshidroquinato sintasa	<i>H. influenzae</i>
143	Cadena alfa de fenilalanil-ARNt sintetasa	<i>H. influenzae</i>
105	Glutamato 5-quinasa	<i>H. influenzae</i>
100	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	<i>H. influenzae</i>
1512	Lipoproteína E	<i>H. influenzae</i>
1105	Proteína de membrana externa P2	<i>H. influenzae</i>
718	Peroxisredoxina híbrida hyPrx5	<i>H. influenzae</i>
361	Proteína de membrana externa P5	<i>H. influenzae</i>
354	Tripsina OS=Sus scrofa	<i>Sus scrofa</i>
255	2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato N-succiniltransferasa	<i>H. influenzae</i>
168	Glutamina amidotransferasa HI 1037 putativa	<i>H. influenzae</i>
167	Proteína PstB de unión a ATP de importación de fosfato	<i>H. influenzae</i>
124	Dihidrodipicolinato reductasa	<i>H. influenzae</i>
118	Región C de cadena kappa de Ig	<i>M. musculus</i>

5 Las proteínas aisladas también se purificaron usando cromatografía catiónica y en gel. La proteína OMP P2 y OMP P5 purificada se usará para generar anticuerpos monoclonales para su uso en los métodos, inmunoensayos y dispositivos de la invención. Es crucial que los anticuerpos usados en los métodos, inmunoensayos y dispositivos de la invención sean altamente específicos. Los anticuerpos policlonales de chinchilla actualmente disponibles no presentan la necesaria especificidad para llevar a cabo los métodos de la invención.

10 Ejemplo 5

Generación de anticuerpos monoclonales

15 Las proteínas OMP P2 y OMP P5 purificadas descritas en el Ejemplo 4 se usan para generar anticuerpos monoclonales para su uso en los métodos, inmunoensayos y dispositivos de la invención usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

20 Por ejemplo, se inmoviliza un ratón intraperitonealmente con la proteína OMP P2 purificada o proteína OMP P5 purificada. Cuatro días después, el ratón se sacrifica y las células de bazo se fusionan con células de mieloma murino usando métodos estándar en la técnica. Por ejemplo, la tecnología de hibridoma se describe en Kohler y col., *Nature* 256:495, la técnica de hibridoma de linfocito B humano se describe en Kozbor y col., *Immunol. Today* 4, 72 (1983), la técnica de hibridoma VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos se describe en Cole y col. "Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy" (1985) Allen R. Bliss, Inc., página 77-96, y los métodos de cribado de bibliotecas de anticuerpo combinatorias se describen en Huse y col., *Science* 246, 1.275 (1989).

25 Las células fusionadas se clonan en una placa de 96 pocillos para la selección de colonia única. Siete a diez días después de la fusión, los sobrenadantes de cultivo de cada pocillo con colonias se evaluaron por la presencia de anticuerpos anti-OMP P2 o anti-OMP P5. Dos a cuatro semanas después de la clonación, los sobrenadantes de colonias celulares únicas se investigan para la presencia de nuevo de anticuerpos anti-OMP P2 o anti-OMP P5. Los pocillos con reacciones positivas se desarrollan más en pocillos más grandes y se desarrollan finalmente en matraces para recolectar más sobrenadante para ensayo adicional.

30 Las células de hibridoma de los clones positivos se inyectan en ratones prístinos para la producción de ascitis. Los anticuerpos monoclonales se purifican de las ascitis, y la especificidad de los anticuerpos monoclonales purificados se ensaya usando ensayos estándar conocidos en la técnica.

35 Ejemplo 6

Inmunoensayos de la invención

40 Anticuerpos anti-OMP P2 y OMP P5, como se describen en el Ejemplo 5, se usan para determinar el perfil proteico de un paciente humano que padece de sinusitis. Las muestras de secreción se obtienen del tracto respiratorio superior de los pacientes. Estas muestras se analizan como se describe en el Ejemplo 1 para la presencia de al

menos OMP P5, OMP P2, HMW1 o HMW2. El perfil proteico de los pacientes se compara con el perfil proteico de referencia generado de los sobrenadantes de biopelículas de HiNT *in vitro* como se describió anteriormente.

5 Los parámetros de sensibilidad y especificidad para el uso de anticuerpos monoclonales anti-OMP P2 y anti-OMP P5, como se describen en el Ejemplo 5, se determinan frente a ensayo de PCR en tiempo real estándar de oro usando hpd como cebador para la detección de *Haemophilus influenzae* no tipificable que se ha mostrado que es específico 100 % y sensible para la detección de cepas de HiNT 86-028NP, 1128MEE, 1714, 1748, 1885MEE y 2019 y diversos aislados clínicos de *Moraxella catarrhalis*.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Das, et al.

15 <120> MÉTODO DE DETECCIÓN DIAGNÓSTICA ESPECÍFICA A MICROBIO BASADO EN LA PROTEÓMICA PARA SINUSITIS CRÓNICA

<130> 28335/46294A

20 <150> 61/493.829
<151> 06-06-2011

<160> 13

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 365

<212> PRT

30 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 1

ES 2 649 370 T3

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

ES 2 649 370 T3

Gly Ile Asp Gly Leu Val Leu Gly Ala Asn Tyr Leu Leu Ala Gln Glu
 165 170 175

Arg His Lys Tyr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Arg Ala Val Thr Val Ala
 180 185 190

Gly Glu Val Tyr Pro Gln Lys Ile Ser Asn Gly Val Gln Val Gly Ala
 195 200 205

Lys Tyr Asp Ala Asn Asn Ile Ile Ala Gly Ile Ala Tyr Gly Arg Thr
 210 215 220

Asn Tyr Arg Glu Asp Ile Val Asp Pro Asp Leu Gly Lys Lys Gln Gln
 225 230 235 240

Val Asn Gly Ala Leu Ser Thr Leu Gly Tyr Arg Phe Ser Asp Leu Gly
 245 250 255

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

Asp Lys His Glu Lys Ser Tyr Phe Val Ser Pro Gly Phe Gln Tyr Glu
 275 280 285

Leu Met Glu Asp Thr Asn Val Tyr Gly Asn Phe Lys Tyr Glu Arg Asp
 290 295 300

Ser Val Asp Gln Gly Lys Lys Thr Arg Glu Gln Ala Val Leu Phe Gly
 305 310 315 320

Val Asp His Lys Leu His Lys Gln Val Leu Thr Tyr Ile Glu Gly Ala
 325 330 335

Tyr Ala Arg Thr Arg Thr Thr Glu Gln Ala Lys Gly Val Lys Thr Glu
 340 345 350

Lys Glu Lys Ser Val Gly Val Gly Leu Arg Val Tyr Phe
 355 360 365

<210> 2
 <211> 1492
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 2

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

5

10

ES 2 649 370 T3

Val Ala Val Ser Glu Leu Thr Arg Gly Cys Asp His Ser Thr Glu Lys
20 25 30

Gly Ser Glu Lys Pro Val Arg Thr Lys Val Arg His Leu Ala Leu Lys
35 40 45

Pro Leu Ser Ala Ile Leu Leu Ser Leu Gly Met Ala Ser Ile Pro Gln
50 55 60

Ser Val Leu Ala Ser Gly Leu Gln Gly Met Ser Val Val His Gly Thr
65 70 75 80

Ala Thr Met Gln Val Asp Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Asn Ser Val
85 90 95

Asn Ala Ile Ile Asn Trp Lys Gln Phe Asn Ile Asp Gln Asn Glu Met
100 105 110

Val Gln Phe Leu Gln Glu Ser Ser Asn Ser Ala Val Phe Asn Arg Val
115 120 125

Thr Ser Asp Gln Ile Ser Gln Leu Lys Gly Ile Leu Asp Ser Asn Gly
130 135 140

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

Ile Ile Asn Thr Asn Gly Phe Thr Ala Ser Thr Leu Asp Ile Ser Asn
165 170 175

Glu Asn Ile Lys Ala Arg Asn Phe Thr Leu Glu Gln Thr Lys Asp Lys
180 185 190

Ala Leu Ala Glu Ile Val Asn His Gly Leu Ile Thr Val Gly Lys Asp
195 200 205

Gly Ser Val Asn Leu Ile Gly Gly Lys Val Lys Asn Glu Gly Val Ile
210 215 220

Ser Val Asn Gly Gly Ser Ile Ser Leu Leu Ala Gly Gln Lys Ile Thr
225 230 235 240

Ile Ser Asp Ile Ile Asn Pro Thr Ile Thr Tyr Ser Ile Ala Ala Pro
245 250 255

Glu Asn Glu Ala Ile Asn Leu Gly Asp Ile Phe Ala Lys Gly Gly Asn
260 265 270

ES 2 649 370 T3

Ile Asn Val Arg Ala Ala Asn Ile Arg Asn Gln Gly Lys Leu Ser Ala
 275 280 285

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

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

Ala Lys Gly Gly Lys Leu Met Ile Thr Gly Asp Lys Val Thr Leu Lys
 325 330 335

Thr Gly Ala Val Ile Asp Leu Ser Gly Lys Glu Gly Gly Glu Thr Tyr
 340 345 350

Leu Gly Gly Asp Glu Arg Gly Glu Gly Lys Asn Gly Ile Gln Leu Ala
 355 360 365

Lys Lys Thr Ser Leu Glu Lys Gly Ser Thr Ile Asn Val Ser Gly Lys
 370 375 380

Glu Lys Gly Gly Arg Ala Ile Val Trp Gly Asp Ile Ala Leu Ile Asp
 385 390 395 400

Gly Asn Ile Asn Ala Gln Gly Lys Asp Ile Ala Lys Thr Gly Gly Phe
 405 410 415

Val Glu Thr Ser Gly His Tyr Leu Ser Ile Gly Asn Asp Ala Ala Val
 420 425 430

Glu Ala Lys Glu Trp Leu Leu Asp Pro Asp Asn Val Thr Ile Ser Asn
 435 440 445

Gly Asn Asp Asp Gln Ser Gln Leu Lys Asp Asp Arg Gly Asp Ser Pro
 450 455 460

Asn Lys Ile Leu Ala Asp Asn Lys His Thr Val Asn Asn Lys Thr Leu
 465 470 475 480

Ser Thr Ala Leu Ala Lys Gly Ile Gly Val Asn Ile Ser Ala Lys Lys
 485 490 495

Lys Val Asn Val Thr Ala Asp Ile Asn Val His Asn Gly Thr Leu Thr
 500 505 510

Leu His Ser Glu Gln Gly Gly Val Glu Ile Asn Gly Asp Ile Thr Ser
 515 520 525

ES 2 649 370 T3

Glu Gln Asn Gly Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Ser Trp Val Asp Val
 530 535 540

His Lys Asn Ile Thr Ile Gly Met Gly Phe Leu Asn Ile Thr Ala Gly
 545 550 555 560

Gly Ser Val Ala Phe Glu Lys Ala Gly Gly Asp Lys Gly Arg Ala Ala
 565 570 575

Ser Asp Ala Lys Ile Val Ala Gln Gly Val Ile Thr Ala Gly Ser Gly
 580 585 590

Gln Asp Phe Arg Phe Asn Asn Val Ser Leu Asn Gly Thr Gly Arg Gly
 595 600 605

Leu Lys Phe Ile Thr Ala Lys Gly Asn Lys Gly Asn Phe Ser Ala Lys
 610 615 620

Phe Asp Gly Val Leu Asn Ile Ser Gly Asn Ile Ser Ile Asn His Thr
 625 630 635 640

Ala Asn Asn Gln Leu Ser Tyr Phe His Arg Gln Gly Tyr Thr Tyr Trp
 645 650 655

Asn Leu Thr Gln Leu Asn Val Asp Ser Asp Ser Ser Phe Ser Leu Thr
 660 665 670

Ser Ile Lys Asp Ala Ile Lys Val Gly Gly Tyr Asp Asn Ala Lys Asp
 675 680 685

Lys Lys Asn Thr Gly Gly Ile Gly Phe Thr Arg Asp Thr Ile Phe Asn
 690 695 700

Val Lys Gln Gly Ala Arg Val Asp Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Ser
 705 710 715 720

Pro Val Lys Asn Ser Arg Ile Ala Ala Val Asn Phe Asp Gly Asn Ile
 725 730 735

Thr Val Lys Gly Gly Gly Val Val Asn Leu Lys Phe Asn Ala Leu Ser
 740 745 750

Asn Asn Tyr Lys Thr Pro Gly Val Asn Ile Ser Ser Arg Phe Ile Asn
 755 760 765

Val Thr Glu Gly Ser Gln Leu Asn Ile Thr Gly Ser Met Pro Ser Thr

ES 2 649 370 T3

770						775						780				
Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Ala	Asn	Asp	Leu	Ile	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ser	
785					790					795					800	
Phe	Val	Ser	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Thr	Asp	Thr	His	Leu	Asp	Thr	
				805					810					815		
Gly	Leu	Lys	Val	Asn	Gly	Asn	Val	Thr	Ile	Lys	Gly	Gly	Asn	Val	Thr	
			820					825					830			
Leu	Gly	Ser	Asn	Lys	Ala	Lys	Thr	Lys	Phe	Asp	Lys	Asn	Val	Thr	Val	
		835					840					845				
Glu	Lys	Gly	Ala	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Ala	Asn	Phe	Gly	Asn	His	
	850					855					860					
Lys	Gly	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Gly	Asn	Ile	Asn	Thr	Gln	Gly	Lys	Leu	
865					870					875					880	
Val	Ala	Thr	Gly	Asp	Thr	Ile	Asp	Val	Ser	Gly	Asp	Phe	Thr	Val	Gly	
				885					890					895		
Asn	Asp	Ala	Thr	Phe	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Asn	Asn	Leu	Asn	Ile	Thr	
			900					905					910			
Gly	Asn	Phe	Thr	Asn	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Ile	Asp	Val	Lys	Lys	Gly	
		915					920					925				
Ala	Ala	Lys	Leu	Gly	Asn	Ile	Thr	Asn	Glu	Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	
	930					935					940					
Thr	His	Ala	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Thr	Ile	Ile	Thr	Gly	Asn	Ile	Thr	
945					950					955					960	
Asn	Lys	Lys	Gly	Asp	Leu	Asn	Ile	Arg	Asp	Asn	Lys	Asn	Asn	Ala	Glu	
				965					970					975		
Ile	Gln	Ile	Gly	Gly	Asn	Ile	Ser	Gln	Lys	Glu	Gly	Asn	Leu	Thr	Ile	
			980					985					990			
Ser	Ser	Asp	Lys	Val	Asn	Ile	Thr	Lys	Gln	Ile	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	
		995					1000					1005				
Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Ser	Asp	Ser	Gly	Thr	Glu	Asn	Asn	Ala	Asn		
	1010					1015					1020					

ES 2 649 370 T3

Leu Thr Ile Lys Thr Lys Thr Leu Glu Leu Thr Asn Asn Leu Asn
1025 1030 1035

Ile Ser Gly Phe His Lys Ala Glu Ile Thr Ala Lys Asp Asn Ser
1040 1045 1050

Asp Leu Ile Ile Gly Lys Ala Ser Ser Asp Ser Gly Asn Ala Gly
1055 1060 1065

Ala Gln Lys Val Ile Phe Asp Lys Val Lys Asp Ser Lys Ile Ser
1070 1075 1080

Ala Gly Asn His Asn Val Thr Leu Asn Ser Glu Val Glu Thr Ser
1085 1090 1095

Asn Gly Asn Ser Asn Ala Ala Gly Asp Ser Asn Gly Asn Asn Ala
1100 1105 1110

Gly Leu Thr Ile Ser Ala Lys Asp Val Ala Val Asn Asn Asn Ile
1115 1120 1125

Thr Ser His Lys Thr Ile Asn Ile Ser Ala Thr Thr Gly Asn Val
1130 1135 1140

Thr Thr Lys Glu Gly Thr Thr Ile Asn Ala Thr Thr Gly Gly Val
1145 1150 1155

Glu Val Thr Ala Lys Thr Gly Asp Ile Lys Gly Gly Ile Glu Ser
1160 1165 1170

Lys Ser Gly Gly Val Thr Leu Thr Ala Thr Gly Asp Thr Leu Ala
1175 1180 1185

Val Gly Asn Ile Ser Gly Asn Thr Val Ser Val Thr Ala Asn Ser
1190 1195 1200

Gly Thr Leu Thr Thr Lys Ala Asp Ser Thr Ile Lys Gly Thr Gly
1205 1210 1215

Ser Val Thr Thr Leu Ser Gln Ser Gly Asp Ile Gly Gly Thr Ile
1220 1225 1230

Ser Gly Lys Thr Val Ser Val Thr Ala Thr Thr Asp Ser Leu Thr
1235 1240 1245

Val Lys Gly Gly Ala Lys Ile Asn Ala Thr Glu Gly Thr Ala Thr
1250 1255 1260

ES 2 649 370 T3

Leu Thr Ala Ser Ser Gly Lys Leu Thr Thr Glu Ala Ser Ser Ser
 1265 1270 1275

 Ile Thr Ser Ala Lys Gly Gln Val Asp Leu Ser Ala Arg Asp Gly
 1280 1285 1290

 Asn Ile Gly Gly Ser Ile Asn Ala Ala Asn Val Thr Leu Asn Thr
 1295 1300 1305

 Thr Gly Thr Leu Thr Thr Val Lys Gly Ser Ser Ile Asn Ala Asn
 1310 1315 1320

 Ser Gly Thr Leu Val Ile Asn Ala Glu Asp Ala Lys Leu Asp Gly
 1325 1330 1335

 Thr Ala Ser Gly Asp Arg Thr Val Val Asn Ala Thr Asn Ala Ser
 1340 1345 1350

 Gly Ser Gly Ser Val Thr Ala Val Thr Ser Ser Ser Val Asn Ile
 1355 1360 1365

 Thr Gly Asp Leu Ser Thr Ile Asn Gly Leu Asn Ile Ile Ser Lys
 1370 1375 1380

 Asn Gly Lys Asn Thr Val Val Leu Lys Gly Ala Glu Ile Asp Val
 1385 1390 1395

 Lys Tyr Ile Gln Pro Gly Val Ala Ser Ala Glu Glu Val Ile Glu
 1400 1405 1410

 Ala Lys Arg Ala Leu Glu Lys Val Lys Asp Leu Ser Asp Glu Glu
 1415 1420 1425

 Arg Glu Thr Leu Ala Lys Leu Gly Val Ser Ala Val Arg Phe Val
 1430 1435 1440

 Glu Pro Asn Asn Ala Ile Thr Val Asn Thr Gln Asn Glu Phe Thr
 1445 1450 1455

 Thr Arg Pro Ser Ser Gln Val Thr Ile Ser Glu Gly Lys Ala Cys
 1460 1465 1470

 Phe Ser Ser Gly Asp Gly Ala Ala Val Cys Thr Asn Val Ala Asp
 1475 1480 1485

 Asp Gly Gln Gln
 1490

ES 2 649 370 T3

<210> 3
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

5

<400> 3

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

Ala Met Gln Ala Asn Ala Lys Phe Lys Val Val Thr Thr Phe Thr Val
 20 25 30

Ile Gln Asp Ile Ala Gln Asn Val Ala Gly Asp Ala Ala Thr Val Glu
 35 40 45

Ser Ile Thr Lys Pro Gly Ala Glu Ile His Glu Tyr Glu Pro Thr Pro
 50 55 60

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

Leu Asn Leu Glu Arg Trp Phe Glu Arg Phe Phe Gln Asn Val Lys Asp
 85 90 95

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

Glu Gly Pro Tyr Lys Asp Ala Pro Asn Pro His Ala Trp Met Ser Pro
 115 120 125

Ser Asn Ala Leu Ile Tyr Ile Glu Asn Ile Lys Asn Ala Leu Val Lys
 130 135 140

Tyr Asp Pro Gln Asn Ala Ala Val Tyr Glu Lys Asn Ala Ala Asp Tyr
 145 150 155 160

Ala Gln Lys Ile Lys Gln Leu Asp Glu Pro Leu Arg Ala Lys Leu Ala
 165 170 175

Gln Ile Pro Glu Ala Gln Arg Trp Leu Val Thr Ser Glu Gly Ala Phe
 180 185 190

Ser Tyr Leu Ala Lys Asp Tyr Asn Leu Lys Glu Gly Tyr Leu Trp Pro
 195 200 205

Ile Asn Ala Glu Gln Gln Gly Thr Pro Gln Gln Val Arg Lys Val Ile
 210 215 220

ES 2 649 370 T3

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

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

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

Val Pro Thr Tyr Ile Asp Leu Leu Asn Val Thr Val Ser Thr Ile Val
 275 280 285

Lys Gly Phe Gly Lys
 290

<210> 4
 <211> 1794
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

5

<400> 4

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

Tyr Ala Leu Thr Pro Tyr Thr Glu Ala Ala Leu Val Arg Asn Asp Val
 20 25 30

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

Val Gly Ala Thr Asn Val Glu Val Arg Asp Asn Lys Asn Asn Asn Leu
 50 55 60

Gly Ser Ala Leu Pro Lys Asp Ile Pro Met Ile Asp Phe Ser Ala Val
 65 70 75 80

Asp Val Asp Lys Arg Ile Ala Thr Leu Val Asn Pro Gln Tyr Val Val
 85 90 95

Gly Val Lys His Val Gly Asn Gly Val Gly Glu Leu His Phe Gly Asn
 100 105 110

Leu Asn Gly Asn Trp Asn Pro Lys Phe Gly Asn Ser Ile Gln His Arg
 115 120 125

Asp Val Ser Trp Glu Glu Asn Arg Tyr Tyr Thr Val Glu Lys Asn Asn
 130 135 140

10

ES 2 649 370 T3

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

ES 2 649 370 T3

Gln Gly Gly Ser Pro Thr Ala Glu Met Pro Cys Tyr Ser Ser Glu Lys
645 650 655

Ser Asp Ala Asn Trp Glu Phe Met Gly Asp Asn Gln Asn Asp Ala Gln
660 665 670

Lys Lys Ala Met Val Tyr Ile Asn Asn Arg Arg Met Asn Gly Phe Asn
675 680 685

Gly Tyr Phe Gly Glu Glu Ala Thr Lys Ala Asp Gln Asn Gly Lys Leu
690 695 700

Asn Val Thr Phe Ser Gly Lys Ser Asp Gln Asn Arg Phe Leu Leu Thr
705 710 715 720

Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Glu Leu Lys Val Glu Lys Gly Thr Leu
725 730 735

Phe Leu Ser Gly Arg Pro Thr Pro His Ala Arg Asp Ile Ala Asn Ile
740 745 750

Ser Ser Thr Glu Lys Asp Lys His Phe Ala Glu Asn Asn Glu Val Val
755 760 765

Val Glu Asp Asp Trp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Ala Thr Asn Ile Asn
770 775 780

Val Thr Asn Asn Ala Thr Leu Tyr Ser Gly Arg Asn Val Glu Ser Ile
785 790 795 800

Thr Ser Asn Ile Thr Ala Ser Asn Lys Ala Lys Val His Ile Gly Tyr
805 810 815

Lys Ala Gly Asp Thr Val Cys Val Arg Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Val
820 825 830

Thr Cys His Asn Asp Thr Leu Ser Thr Lys Ala Leu Asn Ser Phe Asn
835 840 845

Pro Thr Asn Leu Arg Gly Asn Val Asn Leu Thr Glu Ser Ala Asn Phe
850 855 860

Thr Leu Gly Lys Ala Asn Leu Phe Gly Thr Ile Asn Ser Thr Glu Asn
865 870 875 880

Ser Gln Val Asn Leu Lys Glu Asn Ser His Trp Tyr Leu Thr Gly Asn
885 890 895

ES 2 649 370 T3

Ser Asp Val His Gln Leu Asp Leu Ala Asn Gly His Ile His Leu Asn
 900 905 910

Asn Val Ser Asp Ala Thr Lys Glu Thr Lys Tyr His Thr Leu Asn Ile
 915 920 925

Ser Asn Leu Ser Gly Asn Gly Ser Phe Tyr Tyr Trp Val Asp Phe Thr
 930 935 940

Lys Asn Gln Gly Asp Lys Val Val Val Thr Lys Ser Ala Lys Gly Thr
 945 950 955 960

Phe Thr Leu Gln Val Ala Asn Lys Thr Gly Glu Pro Asn His Asn Glu
 965 970 975

Leu Thr Leu Phe Asp Ala Ser Asn Ala Thr Glu Arg Ser Gly Leu Asn
 980 985 990

Val Ser Leu Ala Asn Gly Lys Val Asp Arg Gly Ala Trp Ser Tyr Thr
 995 1000 1005

Leu Lys Glu Asn Ser Gly Arg Tyr Tyr Leu His Asn Pro Glu Val
 1010 1015 1020

Glu Arg Arg Asn Gln Thr Val Asp Thr Pro Ser Ile Ala Thr Ala
 1025 1030 1035

Asn Asn Met Gln Ala Asp Val Pro Ser Val Ser Asn Asn His Glu
 1040 1045 1050

Glu Thr Ala Arg Val Glu Ala Pro Ile Pro Leu Pro Ala Pro Pro
 1055 1060 1065

Ala Pro Ala Thr Gly Ser Ala Met Ala Asn Glu Gln Pro Glu Thr
 1070 1075 1080

Arg Pro Ala Glu Thr Val Gln Pro Thr Met Glu Asp Thr Asn Thr
 1085 1090 1095

Thr His Pro Ser Gly Ser Glu Pro Gln Ala Asp Thr Thr Gln Ala
 1100 1105 1110

Asp Asp Pro Asn Ser Glu Ser Val Pro Ser Glu Thr Ile Glu Lys
 1115 1120 1125

Val Ala Glu Asn Ser Pro Gln Glu Ser Glu Thr Val Ala Lys Asn
 1130 1135 1140

ES 2 649 370 T3

Glu Gln Lys Ala Thr Glu Thr Thr Ala Gln Asn Asp Glu Val Ala
 1145 1150 1155
 Lys Glu Ala Lys Pro Thr Val Glu Ala Asn Thr Gln Thr Asn Glu
 1160 1165 1170
 Leu Ala Gln Asn Gly Ser Glu Thr Glu Glu Thr Gln Glu Ala Glu
 1175 1180 1185
 Thr Ala Arg Gln Ser Glu Ile Asn Ser Thr Glu Glu Thr Val Val
 1190 1195 1200
 Glu Asp Asp Pro Thr Ile Ser Glu Pro Lys Ser Arg Pro Arg Arg
 1205 1210 1215
 Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Asn Ile Asn Leu Ala Gly Thr Glu
 1220 1225 1230
 Asp Thr Ala Lys Val Glu Thr Glu Lys Thr Gln Glu Ala Pro Gln
 1235 1240 1245
 Val Ala Phe Gln Ala Ser Pro Lys Gln Glu Glu Pro Glu Met Ala
 1250 1255 1260
 Lys Gln Gln Glu Gln Pro Lys Thr Val Gln Ser Gln Ala Gln Pro
 1265 1270 1275
 Glu Thr Thr Thr Gln Gln Ala Glu Pro Ala Arg Glu Asn Val Ser
 1280 1285 1290
 Thr Val Asn Asn Val Lys Glu Ala Gln Pro Gln Ala Lys Pro Thr
 1295 1300 1305
 Thr Val Ala Ala Lys Glu Thr Thr Ala Ser Asn Ser Glu Gln Lys
 1310 1315 1320
 Glu Thr Ala Gln Pro Val Ala Asn Pro Lys Thr Ala Glu Asn Lys
 1325 1330 1335
 Ala Glu Asn Pro Gln Ser Thr Glu Thr Thr Asp Glu Asn Ile His
 1340 1345 1350
 Gln Pro Glu Ala His Thr Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Val Thr
 1355 1360 1365
 Pro Glu Asn Ala Thr Thr Pro Ile Lys Pro Val Glu Asn Lys Thr

ES 2 649 370 T3

1370						1375									1380
Thr	Glu	Ala	Glu	Gln	Pro	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	
1385						1390						1395			
Glu	Asn	Pro	Val	Val	Lys	Asn	Pro	Glu	Asn	Thr	Thr	Pro	Ala	Thr	
1400						1405						1410			
Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Ser	Glu	Thr	Ala	
1415						1420						1425			
Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Ala	Glu	
1430						1435						1440			
Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Ser	Thr	Gln	Glu	Thr	Thr	Val	Asp	Asn	Ser	
1445						1450						1455			
Gly	Ser	Thr	Pro	Gln	Pro	Arg	Ser	Arg	Arg	Thr	Arg	Arg	Ser	Ala	
1460						1465						1470			
Gln	Asn	Ser	Tyr	Glu	Pro	Val	Glu	Leu	His	Thr	Glu	Asn	Ala	Glu	
1475						1480						1485			
Asn	Pro	Gln	Ser	Gly	Asn	Asp	Val	Ala	Thr	Gln	Leu	Val	Leu	Arg	
1490						1495						1500			
Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Asn	Thr	Asn	Ala	Val	Ile	Ser	Asp	Ala	Met	
1505						1510						1515			
Ala	Lys	Ala	Gln	Phe	Val	Ala	Leu	Asn	Val	Gly	Lys	Ala	Val	Ser	
1520						1525						1530			
Gln	His	Ile	Ser	Gln	Leu	Glu	Met	Asn	Asn	Glu	Gly	Gln	Tyr	Asn	
1535						1540						1545			
Val	Trp	Val	Ser	Asn	Thr	Ser	Met	Lys	Glu	Asn	Tyr	Ser	Ser	Ser	
1550						1555						1560			
Gln	Tyr	Arg	His	Phe	Ser	Ser	Lys	Ser	Ala	Gln	Thr	Gln	Leu	Gly	
1565						1570						1575			
Trp	Asp	Gln	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Val	Gln	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	
1580						1585						1590			
Thr	Tyr	Val	Arg	Asn	Ser	Asn	Asn	Phe	Asp	Lys	Ala	Ser	Ser	Lys	
1595						1600						1605			

ES 2 649 370 T3

Asn Thr Leu Ala Gln Ala Asn Leu Tyr Ser Lys Tyr Tyr Met Asp
 1610 1615 1620

Asn His Trp Tyr Leu Ala Val Asp Leu Gly Tyr Gly Asn Phe Gln
 1625 1630 1635

Ser Asn Leu Gln Thr Asn His Asn Ala Lys Phe Ala Arg His Thr
 1640 1645 1650

Ala Gln Phe Gly Leu Thr Ala Gly Lys Ala Phe Asn Leu Gly Asn
 1655 1660 1665

Phe Ala Val Lys Pro Thr Val Gly Val Arg Tyr Ser Tyr Leu Ser
 1670 1675 1680

Asn Ala Asn Phe Ala Leu Ala Lys Asp Arg Ile Lys Val Asn Pro
 1685 1690 1695

Ile Ser Val Lys Thr Ala Phe Ala Gln Val Asp Leu Ser Tyr Thr
 1700 1705 1710

Tyr His Leu Gly Glu Phe Ser Ile Thr Pro Ile Leu Ser Ala Arg
 1715 1720 1725

Tyr Asp Ala Asn Gln Gly Ser Gly Lys Ile Asn Val Asp Arg Tyr
 1730 1735 1740

Asp Phe Ala Tyr Asn Val Glu Asn Gln Gln Gln Tyr Asn Ala Gly
 1745 1750 1755

Leu Lys Leu Lys Tyr His Asn Val Lys Leu Ser Leu Ile Gly Gly
 1760 1765 1770

Leu Thr Lys Ala Lys Gln Ala Glu Lys Gln Lys Thr Ala Glu Val
 1775 1780 1785

Lys Leu Ser Phe Ser Phe
 1790

<210> 5
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*
 <400> 5

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

5

10

ES 2 649 370 T3

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

Lys Ala Gly Gln Gly Ser Phe His Asp Gly Ile Asn Asn Asn Gly Ala
 35 40 45

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

Phe Thr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Tyr Gln Ile Leu Asn Gln Asp Asn
 65 70 75 80

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

Leu Arg Glu Ala Gly Lys Pro Lys Ala Lys His Thr Asn His Gly Ala
 100 105 110

His Leu Ser Leu Lys Gly Ser Tyr Glu Val Leu Asp Gly Leu Asp Val
 115 120 125

Tyr Gly Lys Ala Gly Val Ala Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr
 130 135 140

Glu Val Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr Ala
 145 150 155 160

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

Glu Leu Ala Val Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Leu Thr Arg Val Gly Lys
 180 185 190

Tyr Arg Pro Gln Asp Lys Pro Asn Thr Ala Ile Asn Tyr Asn Pro Trp
 195 200 205

Ile Gly Ser Ile Asn Ala Gly Ile Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Gly Glu
 210 215 220

Ala Pro Val Val Ala Ala Pro Glu Met Val Ser Lys Thr Phe Ser Leu
 225 230 235 240

Asn Ser Asp Val Thr Phe Ala Phe Gly Lys Ala Asn Leu Lys Pro Gln
 245 250 255

Ala Gln Ala Thr Leu Asp Ser Val Tyr Gly Glu Ile Ser Gln Val Lys
 260 265 270

Ser Ala Lys Val Ala Val Ala Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Asp
 275 280 285

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

Tyr Phe Val Ala Lys Gly Val Ala Ala Asp Ala Ile Ser Ala Thr Gly
 305 310 315 320

Tyr Gly Lys Ala Asn Pro Val Thr Gly Ala Thr Cys Asp Gln Val Lys
 325 330 335

Gly Arg Lys Ala Leu Ile Ala Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu
 340 345 350

Ile Ala Val Asn Gly Thr Lys
 355

<210> 6
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

5

<400> 6

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

Ser Phe Ala Ala Asp Asn Arg Ile Gly Val Thr Ile Tyr Lys Tyr Asp
 20 25 30

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

Val Val Gly Gly Ile Lys Leu Leu Met Asn Asp Ser Gln Asn Ala Gln
 50 55 60

Ser Ile Gln Asn Asp Gln Val Asp Ile Leu Leu Ser Lys Gly Val Lys
 65 70 75 80

Ala Leu Ala Ile Asn Leu Val Asp Pro Ala Ala Ala Pro Thr Ile Ile
 85 90 95

Gly Lys Ala Lys Ser Asp Asn Ile Pro Val Val Phe Phe Asn Lys Asp
 100 105 110

Pro Gly Ala Lys Ala Ile Gly Ser Tyr Glu Gln Ala Tyr Tyr Val Gly
 115 120 125

10

ES 2 649 370 T3

Thr Asp Pro Lys Glu Ser Gly Leu Ile Gln Gly Asp Leu Ile Ala Lys
130 135 140

Gln Trp Lys Ala Asn Pro Ala Leu Asp Leu Asn Lys Asp Gly Lys Ile
145 150 155 160

Gln Phe Val Leu Leu Lys Gly Glu Pro Gly His Pro Asp Ala Glu Val
165 170 175

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

Glu Gln Leu Phe Ile Asp Thr Gly Met Trp Asp Ala Ala Met Ala Lys
195 200 205

Asp Lys Val Asp Ala Trp Leu Ser Ser Ser Lys Ala Asn Asp Ile Glu
210 215 220

Val Ile Ile Ser Asn Asn Asp Gly Met Ala Leu Gly Ala Leu Glu Ala
225 230 235 240

Thr Lys Ala His Gly Lys Lys Leu Pro Ile Phe Gly Val Asp Ala Leu
245 250 255

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

Leu Asn Asp Ser Val Asn Gln Gly Lys Ala Val Val Gln Leu Ser Asn
275 280 285

Asn Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gly Thr Lys Met Gly Ile
290 295 300

Lys Arg Pro Cys Cys Thr His Ser Leu Cys Trp Cys Gly
305 310 315

<210> 7
 <211> 1542
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*
 <400> 7

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

Val Ala Val Ser Glu Leu Thr Arg Gly Cys Asp His Ser Thr Glu Lys
20 25 30

5

10

ES 2 649 370 T3

Gly Ser Glu Lys Pro Val Arg Thr Lys Val Arg His Leu Ala Leu Lys
 35 40 45

Pro Leu Ser Ala Ile Leu Leu Ser Leu Gly Met Ala Ser Ile Pro Gln
 50 55 60

Ser Val Leu Ala Ser Gly Leu Gln Gly Met Ser Val Val His Gly Thr
 65 70 75 80

Ala Thr Met Gln Val Asp Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Asn Ser Val
 85 90 95

Asn Ala Ile Ile Asn Trp Lys Gln Phe Asn Ile Asp Gln Asn Glu Met
 100 105 110

Val Gln Phe Leu Gln Glu Asn Asn Asn Ser Ala Val Phe Asn Arg Val
 115 120 125

Thr Ser Asp Gln Ile Ser Gln Leu Lys Gly Ile Leu Asp Ser Asn Gly
 130 135 140

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

Ile Ile Asn Thr Asn Gly Phe Thr Ala Ser Thr Leu Asp Ile Ser Asn
 165 170 175

Glu Asn Ile Lys Ala Arg Asn Phe Thr Leu Glu Gln Thr Lys Asp Lys
 180 185 190

Ala Leu Ala Glu Ile Val Asn His Gly Leu Ile Thr Val Gly Lys Asp
 195 200 205

Gly Ser Val Asn Leu Ile Gly Gly Lys Val Lys Asn Glu Gly Val Ile
 210 215 220

Ser Val Asn Gly Gly Ser Ile Ser Leu Leu Ala Gly Gln Lys Ile Thr
 225 230 235 240

Ile Ser Asp Ile Ile Asn Pro Thr Ile Thr Tyr Ser Ile Ala Ala Pro
 245 250 255

Glu Asn Glu Ala Ile Asn Leu Gly Asp Ile Phe Ala Lys Gly Gly Asn
 260 265 270

Ile Asn Val Arg Ala Ala Thr Ile Arg Asn Lys Gly Lys Leu Ser Ala
 275 280 285

ES 2 649 370 T3

Asp Ser Val Ser Lys Asp Lys Ser Gly Asn Ile Ile Leu Ser Ala Lys
 290 295 300
 Glu Gly Glu Ala Glu Ile Ser Gly Val Ile Ser Ala Gln Asn Gln Gln
 305 310 315 320
 Ala Lys Gly Gly Lys Leu Met Ile Thr Gly Asp Lys Val Thr Leu Lys
 325 330 335
 Thr Gly Ala Val Ile Asp Leu Ser Gly Lys Glu Gly Gly Glu Thr Tyr
 340 345 350
 Leu Gly Gly Asp Glu Arg Gly Glu Gly Lys Asn Gly Ile Gln Leu Ala
 355 360 365
 Lys Lys Thr Ser Leu Glu Lys Gly Ser Thr Ile Asn Val Ser Gly Lys
 370 375 380
 Glu Lys Gly Gly Arg Ala Ile Val Trp Gly Asp Ile Ala Leu Ile Asp
 385 390 395 400
 Gly Asn Ile Asn Ala Gln Gly Ser Asp Ile Ala Lys Thr Gly Gly Phe
 405 410 415
 Val Glu Thr Ser Gly His Tyr Leu Ser Ile Asp Ser Asn Ala Ile Val
 420 425 430
 Lys Thr Lys Glu Trp Leu Leu Asp Pro Asp Asn Val Thr Ile Glu Ala
 435 440 445
 Pro Ser Leu Ser Arg Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ser Glu Phe Pro Ile
 450 455 460
 Gly Asp Gly Thr Glu Asn Ser Pro Lys Lys Asn Ala Asp Lys Thr Ile
 465 470 475 480
 Leu Thr Asn Glu Thr Ile Ser Asn Phe Leu Gln Asn Ala Lys Val Met
 485 490 495
 Asn Ile Thr Ala Lys Arg Lys Leu Thr Val Asn Ser Ser Ile Ser Ile
 500 505 510
 Gly Ser Arg Ser His Leu Ile Leu His Ser Glu Gly Gln Gly Asp Gly
 515 520 525
 Gly Val Gln Ile Asp Gly Asp Ile Thr Ser Glu Gly Gly Asn Leu Thr

ES 2 649 370 T3

530				535				540							
Ile	Asn	Ser	Gly	Gly	Trp	Val	Asp	Val	His	Lys	Asn	Ile	Thr	Leu	Gly
545					550					555					560
Thr	Gly	Phe	Leu	Asn	Ile	Thr	Ala	Gly	Gly	Ser	Val	Ala	Phe	Glu	Lys
				565					570					575	
Gly	Gly	Asn	Asn	Ala	Arg	Asn	Ala	Thr	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Gln
			580					585					590		
Gly	Thr	Ile	Thr	Val	Asn	Lys	Asp	Asp	Lys	Gln	Phe	Arg	Phe	Asn	Asn
		595					600					605			
Val	Ser	Ile	Asn	Gly	Thr	Gly	Glu	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ala	Asn	Gln
	610					615					620				
Asn	Asn	Phe	Thr	His	Lys	Phe	Asp	Gly	Glu	Ile	Asn	Ile	Ser	Gly	Ile
625					630					635					640
Val	Thr	Ile	Asn	Gln	Thr	Thr	Lys	Lys	Asp	Ala	Lys	Tyr	Trp	His	Ala
				645					650					655	
Ser	Lys	Asp	Ser	Tyr	Trp	Asn	Val	Ser	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	Asp
			660					665					670		
Ala	Lys	Phe	Thr	Phe	Ile	Lys	Phe	Val	Asp	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln
		675					680						685		
Asp	Leu	Arg	Ser	Ala	Arg	Arg	Arg	Phe	Ala	Gly	Val	His	Phe	Asn	Gly
690						695					700				
Thr	Gly	Gly	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	Ile	Gly	Ala	Asn	Ala	Lys	Ala	Leu
705					710					715					720
Phe	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Ala	Ala	Thr	Asp	Pro	Lys	Lys	Glu	Leu	Pro
				725					730				735		
Ile	Thr	Phe	Asn	Ala	Asn	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser
			740					745					750		
Val	Met	Phe	Asp	Ile	His	Ala	Asn	Leu	Thr	Ser	Arg	Ala	Ala	Ser	Ile
		755					760					765			
Asn	Met	Asp	Ser	Ile	Asn	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu	Asp	Phe	Ser	Ile	Thr
770						775					780				

ES 2 649 370 T3

Ser His Asn Arg Asn Ser Asn Ala Phe Glu Ile Lys Lys Asp Leu Thr
785 790 795 800

Ile Asn Ala Thr Asn Ser Lys Phe Ser Leu Lys Gln Thr Lys Asp Leu
805 810 815

Phe Glu Asn Gln Tyr Thr Gly Asp Ala Ile Asn Ser Thr Arg Asn Leu
820 825 830

Thr Ile Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gly Gly Glu Asn Ser Ser Ser
835 840 845

Asn Ile Thr Gly Asn Ile Thr Ile Ala Ala Glu Ala Asn Val Thr Leu
850 855 860

Gln Ala Tyr Ala Asp Asn Ser Ile Lys Gly His Lys Lys Lys Thr Leu
865 870 875 880

Thr Leu Gly Asn Val Ser Thr Ser Gly Asn Leu Ser Leu Thr Gly Ser
885 890 895

Lys Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Ala Val Leu Asn Gly Ala Thr Phe
900 905 910

Lys Gly Glu Thr Asn Asp Ser Leu Asn Ile Thr Gly Thr Phe Thr Asn
915 920 925

Asn Gly Thr Ala Asp Ile Asn Ile Lys Arg Gly Val Val Asn Ile Gln
930 935 940

Gly Asp Ile Thr Asn Lys Gly Gly Leu Asn Ile Thr Thr Asn Ala Gln
945 950 955 960

Lys Asn Gln Lys Thr Ile Ile Asn Gly Asn Ile Thr Asn Lys Lys Gly
965 970 975

Asn Leu Asn Ile Thr Asn Asn Gly Asn Asp Thr Glu Ile Gln Ile Gly
980 985 990

Gly Asn Ile Ser Gln Lys Glu Gly Asn Leu Thr Ile Ser Ser Asp Lys
995 1000 1005

Val Asn Ile Thr Lys Gln Ile Thr Ile Lys Ala Gly Val Asp Glu
1010 1015 1020

Lys Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ala Ser Asp Ala Asn Leu Thr Ile
1025 1030 1035

Lys Thr Lys Glu Leu Lys Leu Val Glu Asp Leu Asn Ile Ser Gly
 1040 1045 1050

Phe Asn Lys Ala Glu Ile Thr Ala Lys Asp Gly Ser Asp Leu Thr
 1055 1060 1065

Ile Gly Asn Thr Asn Ser Ala Asp Gly Thr Asn Ala Lys Lys Val
 1070 1075 1080

Thr Phe Asn Gln Val Lys Asp Ser Lys Ile Ser Ala Asn Asp His
 1085 1090 1095

Asn Val Thr Leu Asn Ser Lys Val Glu Thr Ser Gly Asn Thr Asp
 1100 1105 1110

Asn Thr Gly Asp Gly Ser Gly Asn Asn Ala Gly Leu Thr Ile Ala
 1115 1120 1125

Ala Lys Asn Val Glu Val Lys Asn Asn Ile Thr Ser Asn Lys Thr
 1130 1135 1140

Val Asn Ile Thr Ala Ser Glu Lys Leu Thr Thr Lys Ala Asp Ala
 1145 1150 1155

Thr Ile Asn Ala Thr Thr Gly Asn Val Glu Val Thr Ala Lys Thr
 1160 1165 1170

Gly Asp Ile Lys Gly Glu Val Lys Ser Thr Ser Gly Asn Val Asn
 1175 1180 1185

Ile Thr Ala Asn Gly Asp Thr Leu Asn Val Ser Asn Val Ser Gly
 1190 1195 1200

Asn Ala Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Gly Lys Leu Thr Thr Gln
 1205 1210 1215

Glu Ser Ser Thr Ile Ser Gly Thr Glu Ser Val Thr Thr Ser Ser
 1220 1225 1230

Gln Ser Gly Asp Ile Gly Gly Ala Ile Ser Gly Asn Thr Val Ser
 1235 1240 1245

Val Lys Ala Thr Asn Asp Leu Ile Thr Lys Ala Asn Ser Lys Ile
 1250 1255 1260

Glu Ala Lys Thr Gly Glu Ala Asn Val Thr Ser Ala Thr Gly Ile
 1265 1270 1275

ES 2 649 370 T3

Ile Gly Gly Thr Ile Ser Gly Asn Thr Val Asn Val Thr Ala Asn
 1280 1285 1290

Thr Gly Ser Leu Thr Ile Lys Gly Gly Ala Lys Val Asp Ala Thr
 1295 1300 1305

Asn Gly Ala Ala Thr Leu Thr Ala Glu Ser Gly Lys Leu Thr Thr
 1310 1315 1320

Gln Ala Gly Ser Thr Ile Thr Ser Asn Asn Gly Gln Thr Thr Leu
 1325 1330 1335

Thr Ala Lys Asp Gly Ser Ile Ala Gly Ser Ile Asp Ala Ala Asn
 1340 1345 1350

Val Thr Leu Asn Thr Thr Gly Thr Leu Thr Thr Val Val Gly Ser
 1355 1360 1365

Ser Ile Asn Ala Asn Glu Gly Thr Leu Val Ile Asn Ala Gln Asp
 1370 1375 1380

Ala Thr Leu Asn Gly Asp Ala Ser Gly Asp Arg Thr Glu Val Asn
 1385 1390 1395

Ala Val Asn Ala Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Ala Val Thr Ser
 1400 1405 1410

Ser Ser Val Asn Ile Thr Gly Asp Leu Ser Thr Ile Asn Gly Leu
 1415 1420 1425

Asn Ile Ile Ser Lys Asn Gly Lys Asn Thr Val Val Leu Lys Gly
 1430 1435 1440

Ala Glu Ile Asp Val Lys Tyr Ile Gln Pro Gly Val Ala Ser Ala
 1445 1450 1455

Glu Glu Val Ile Glu Ala Lys Arg Ala Leu Glu Lys Val Lys Asp
 1460 1465 1470

Leu Ser Asp Glu Glu Arg Glu Thr Leu Ala Lys Leu Gly Val Ser
 1475 1480 1485

Ala Val Arg Phe Val Glu Pro Asn Asn Ala Ile Thr Val Asn Thr
 1490 1495 1500

Gln Asn Glu Phe Thr Thr Arg Pro Ser Ser Gln Val Thr Ile Ser

ES 2 649 370 T3

1505

1510

1515

Glu Gly Lys Ala Cys Phe Ser Ser Gly Asp Gly Ala Ala Val Cys
1520 1525 1530

Thr Asn Val Ala Asp Asp Gly Gln Gln
1535 1540

<210> 8

<211> 334

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 8

5

ES 2 649 370 T3

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

ES 2 649 370 T3

Val Leu Ala Ser Val Lys Pro Leu Gly Phe Ile Asp Ser Ser Ile Ala
1 5 10 15

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

His Asp Tyr Asn Leu Lys Leu Ser Asp Ile Gln Lys Val Lys Ser Ala
35 40 45

Asp Leu Val Val Trp Ile Gly Glu Asp Ile Asp Ser Phe Leu Asp Lys
50 55 60

Pro Ile Ser Gln Ile Glu Arg Lys Lys Val Ile Thr Ile Ala Asp Leu

ES 2 649 370 T3

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

ES 2 649 370 T3

<210> 10
 <211> 1542
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

5

<400> 10

```

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

Val Ala Val Ser Glu Leu Thr Arg Gly Cys Asp His Ser Thr Glu Lys
 20           25           30

Gly Ser Glu Lys Pro Val Arg Thr Lys Val Arg His Leu Ala Leu Lys
 35           40           45

Pro Leu Ser Ala Ile Leu Leu Ser Leu Gly Met Ala Ser Ile Pro Gln
 50           55           60

Ser Val Leu Ala Ser Gly Leu Gln Gly Met Ser Val Val His Gly Thr
 65           70           75           80

Ala Thr Met Gln Val Asp Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Asn Ser Val
 85           90           95

Asn Ala Ile Ile Asn Trp Lys Gln Phe Asn Ile Asp Gln Asn Glu Met
 100          105          110

Val Gln Phe Leu Gln Glu Asn Asn Asn Ser Ala Val Phe Asn Arg Val
 115          120          125

Thr Ser Asp Gln Ile Ser Gln Leu Lys Gly Ile Leu Asp Ser Asn Gly
 130          135          140

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

Ile Ile Asn Thr Asn Gly Phe Thr Ala Ser Thr Leu Asp Ile Ser Asn
 165          170          175

Glu Asn Ile Lys Ala Arg Asn Phe Thr Leu Glu Gln Thr Lys Asp Lys
 180          185          190

Ala Leu Ala Glu Ile Val Asn His Gly Leu Ile Thr Val Gly Lys Asp
 195          200          205

Gly Ser Val Asn Leu Ile Gly Gly Lys Val Lys Asn Glu Gly Val Ile
 210          215          220
    
```


ES 2 649 370 T3

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

ES 2 649 370 T3

Leu Thr Asn Glu Thr Ile Ser Asn Phe Leu Gln Asn Ala Lys Val Met
 485 490 495
 Asn Ile Thr Ala Lys Arg Lys Leu Thr Val Asn Ser Ser Ile Ser Ile
 500 505 510
 Gly Ser Arg Ser His Leu Ile Leu His Ser Glu Gly Gln Gly Asp Gly
 515 520 525
 Gly Val Gln Ile Asp Gly Asp Ile Thr Ser Glu Gly Gly Asn Leu Thr
 530 535 540
 Ile Asn Ser Gly Gly Trp Val Asp Val His Lys Asn Ile Thr Leu Gly
 545 550 555 560
 Thr Gly Phe Leu Asn Ile Thr Ala Gly Gly Ser Val Ala Phe Glu Lys
 565 570 575
 Gly Gly Asn Asn Ala Arg Asn Ala Thr Asp Ala Gln Ile Thr Ala Gln
 580 585 590
 Gly Thr Ile Thr Val Asn Lys Asp Asp Lys Gln Phe Arg Phe Asn Asn
 595 600 605
 Val Ser Ile Asn Gly Thr Gly Glu Gly Leu Lys Phe Ile Ala Asn Gln
 610 620
 Asn Asn Phe Thr His Lys Phe Asp Gly Glu Ile Asn Ile Ser Gly Ile
 625 630 635 640
 Val Thr Ile Asn Gln Thr Thr Lys Lys Asp Ala Lys Tyr Trp His Ala
 645 650 655
 Ser Lys Asp Ser Tyr Trp Asn Val Ser Ser Leu Thr Leu Asn Asp Asp
 660 665 670
 Ala Lys Phe Thr Phe Ile Lys Phe Val Asp Ser Gly Ser Asn Ser Gln
 675 680 685
 Asp Leu Arg Ser Ala Arg Arg Arg Phe Ala Gly Val His Phe Asn Gly
 690 695 700
 Thr Gly Gly Lys Thr Asn Phe Asn Ile Gly Ala Asn Ala Lys Ala Leu
 705 710 715 720
 Phe Lys Leu Lys Pro Asn Ala Ala Thr Asp Pro Lys Lys Glu Leu Pro
 725 730 735

Ile Thr Phe Asn Ala Asn Ile Thr Ala Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser
740 745 750

Val Met Phe Asp Ile His Ala Asn Leu Thr Ser Arg Ala Ala Ser Ile
755 760 765

Asn Met Asp Ser Ile Asn Ile Thr Gly Gly Leu Asp Phe Ser Ile Thr
770 775 780

Ser His Asn Arg Asn Ser Asn Ala Phe Glu Ile Lys Lys Asp Leu Thr
785 790 795 800

Ile Asn Ala Thr Asn Ser Lys Phe Ser Leu Lys Gln Thr Lys Asp Leu
805 810 815

Phe Glu Asn Gln Tyr Thr Gly Asp Ala Ile Asn Ser Thr Arg Asn Leu
820 825 830

Thr Ile Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gly Gly Glu Asn Ser Ser Ser
835 840 845

Asn Ile Thr Gly Asn Ile Thr Ile Ala Ala Glu Ala Asn Val Thr Leu
850 855 860

Gln Ala Tyr Ala Asp Asn Ser Ile Lys Gly His Lys Lys Lys Thr Leu
865 870 875 880

Thr Leu Gly Asn Val Ser Thr Ser Gly Asn Leu Ser Leu Thr Gly Ser
885 890 895

Lys Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Ala Val Leu Asn Gly Ala Thr Phe
900 905 910

Lys Gly Glu Thr Asn Asp Ser Leu Asn Ile Thr Gly Thr Phe Thr Asn
915 920 925

Asn Gly Thr Ala Asp Ile Asn Ile Lys Arg Gly Val Val Asn Ile Gln
930 935 940

Gly Asp Ile Thr Asn Lys Gly Gly Leu Asn Ile Thr Thr Asn Ala Gln
945 950 955 960

Lys Asn Gln Lys Thr Ile Ile Asn Gly Asn Ile Thr Asn Lys Lys Gly
965 970 975

Asn Leu Asn Ile Thr Asn Asn Gly Asn Asp Thr Glu Ile Gln Ile Gly

980

985

990

Gly Asn Ile Ser Gln Lys Glu Gly Asn Leu Thr Ile Ser Ser Asp Lys
 995 1000 1005

Val Asn Ile Thr Lys Gln Ile Thr Ile Lys Ala Gly Val Asp Glu
 1010 1015 1020

Lys Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ala Ser Asp Ala Asn Leu Thr Ile
 1025 1030 1035

Lys Thr Lys Glu Leu Lys Leu Val Glu Asp Leu Asn Ile Ser Gly
 1040 1045 1050

Phe Asn Lys Ala Glu Ile Thr Ala Lys Asp Gly Ser Asp Leu Thr
 1055 1060 1065

Ile Gly Asn Thr Asn Ser Ala Asp Gly Thr Asn Ala Lys Lys Val
 1070 1075 1080

Thr Phe Asn Gln Val Lys Asp Ser Lys Ile Ser Ala Asn Asp His
 1085 1090 1095

Asn Val Thr Leu Asn Ser Lys Val Glu Thr Ser Gly Asn Thr Asp
 1100 1105 1110

Asn Thr Gly Asp Gly Ser Gly Asn Asn Ala Gly Leu Thr Ile Ala
 1115 1120 1125

Ala Lys Asn Val Glu Val Lys Asn Asn Ile Thr Ser Asn Lys Thr
 1130 1135 1140

Val Asn Ile Thr Ala Ser Glu Lys Leu Thr Thr Lys Ala Asp Ala
 1145 1150 1155

Thr Ile Asn Ala Thr Thr Gly Asn Val Glu Val Thr Ala Lys Thr
 1160 1165 1170

Gly Asp Ile Lys Gly Glu Val Lys Ser Thr Ser Gly Asn Val Asn
 1175 1180 1185

Ile Thr Ala Asn Gly Asp Thr Leu Asn Val Ser Asn Val Ser Gly
 1190 1195 1200

Asn Ala Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Gly Lys Leu Thr Thr Gln
 1205 1210 1215

Glu Ser Ser Thr Ile Ser Gly Thr Glu Ser Val Thr Thr Ser Ser
 1220 1225 1230

Gln Ser Gly Asp Ile Gly Gly Ala Ile Ser Gly Asn Thr Val Ser
 1235 1240 1245

Val Lys Ala Thr Asn Asp Leu Ile Thr Lys Ala Asn Ser Lys Ile
 1250 1255 1260

Glu Ala Lys Thr Gly Glu Ala Asn Val Thr Ser Ala Thr Gly Ile
 1265 1270 1275

Ile Gly Gly Thr Ile Ser Gly Asn Thr Val Asn Val Thr Ala Asn
 1280 1285 1290

Thr Gly Ser Leu Thr Ile Lys Gly Gly Ala Lys Val Asp Ala Thr
 1295 1300 1305

Asn Gly Ala Ala Thr Leu Thr Ala Glu Ser Gly Lys Leu Thr Thr
 1310 1315 1320

Gln Ala Gly Ser Thr Ile Thr Ser Asn Asn Gly Gln Thr Thr Leu
 1325 1330 1335

Thr Ala Lys Asp Gly Ser Ile Ala Gly Ser Ile Asp Ala Ala Asn
 1340 1345 1350

Val Thr Leu Asn Thr Thr Gly Thr Leu Thr Thr Val Val Gly Ser
 1355 1360 1365

Ser Ile Asn Ala Asn Glu Gly Thr Leu Val Ile Asn Ala Gln Asp
 1370 1375 1380

Ala Thr Leu Asn Gly Asp Ala Ser Gly Asp Arg Thr Glu Val Asn
 1385 1390 1395

Ala Val Asn Ala Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Ala Val Thr Ser
 1400 1405 1410

Ser Ser Val Asn Ile Thr Gly Asp Leu Ser Thr Ile Asn Gly Leu
 1415 1420 1425

Asn Ile Ile Ser Lys Asn Gly Lys Asn Thr Val Val Leu Lys Gly
 1430 1435 1440

Ala Glu Ile Asp Val Lys Tyr Ile Gln Pro Gly Val Ala Ser Ala
 1445 1450 1455

ES 2 649 370 T3

Glu Glu Val Ile Glu Ala Lys Arg Ala Leu Glu Lys Val Lys Asp
 1460 1465 1470

Leu Ser Asp Glu Glu Arg Glu Thr Leu Ala Lys Leu Gly Val Ser
 1475 1480 1485

Ala Val Arg Phe Val Glu Pro Asn Asn Ala Ile Thr Val Asn Thr
 1490 1495 1500

Gln Asn Glu Phe Thr Thr Arg Pro Ser Ser Gln Val Thr Ile Ser
 1505 1510 1515

Glu Gly Lys Ala Cys Phe Ser Ser Gly Asp Gly Ala Ala Val Cys
 1520 1525 1530

Thr Asn Val Ala Asp Asp Gly Gln Gln
 1535 1540

<210> 11
 <211> 1557
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

5

<400> 11

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

Val Ala Val Ser Glu Leu Thr Arg Gly Cys Asp His Ser Thr Glu Lys
 20 25 30

Gly Ser Glu Lys Pro Val Arg Thr Lys Val Arg His Leu Ala Leu Lys
 35 40 45

Pro Leu Ser Ala Ile Leu Leu Ser Leu Gly Met Ala Ser Ile Pro Gln
 50 55 60

Ser Val Leu Ala Ser Gly Leu Gln Gly Met Ser Val Val His Gly Thr
 65 70 75 80

Ala Thr Met Gln Val Asp Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Asn Ser Val
 85 90 95

Asn Ala Ile Ile Asn Trp Lys Gln Phe Asn Ile Asp Gln Asn Glu Met
 100 105 110

Val Gln Phe Leu Gln Glu Ser Ser Asn Ser Ala Val Phe Asn Arg Val
 115 120 125

10

ES 2 649 370 T3

Thr Ser Asp Gln Ile Ser Gln Leu Lys Gly Ile Leu Asp Ser Asn Gly
 130 135 140

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

Ile Ile Asn Thr Asn Gly Phe Thr Ala Ser Thr Leu Asp Ile Ser Asn
 165 170 175

Glu Asn Ile Lys Ala Arg Asn Phe Thr Leu Glu Gln Thr Lys Asp Lys
 180 185 190

Ala Leu Ala Glu Ile Val Asn His Gly Leu Ile Thr Val Gly Lys Asp
 195 200 205

Gly Ser Val Asn Leu Ile Gly Gly Lys Val Lys Asn Glu Gly Val Ile
 210 215 220

Ser Val Asn Gly Gly Ser Ile Ser Leu Leu Ala Gly Gln Lys Ile Thr
 225 230 235 240

Ile Ser Asp Ile Ile Asn Pro Thr Ile Thr Tyr Ser Ile Ala Ala Pro
 245 250 255

Glu Asn Glu Ala Ile Asn Leu Gly Asp Ile Phe Ala Lys Gly Gly Asn
 260 265 270

Ile Asn Val Arg Ala Ala Asn Ile Arg Asn Gln Gly Lys Leu Ser Ala
 275 280 285

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

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

Ala Lys Gly Gly Lys Leu Met Ile Thr Gly Asp Lys Val Thr Leu Lys
 325 330 335

Thr Gly Ala Val Ile Asp Leu Ser Gly Lys Glu Gly Gly Glu Thr Tyr
 340 345 350

Leu Gly Gly Asp Glu Arg Gly Glu Gly Lys Asn Gly Ile Gln Leu Ala
 355 360 365

Lys Lys Thr Ser Leu Glu Lys Gly Ser Thr Ile Asn Val Ser Gly Lys
 370 375 380

ES 2 649 370 T3

Glu Lys Gly Gly Arg Ala Ile Val Trp Gly Asp Ile Ala Leu Ile Asp
 385 390 395 400
 Gly Asn Ile Asn Ala Gln Gly Lys Asp Ile Ala Lys Thr Gly Gly Phe
 405 410 415
 Val Glu Thr Ser Gly His Tyr Leu Ser Ile Gly Asn Asp Ala Ala Val
 420 425 430
 Glu Ala Lys Glu Trp Leu Leu Asp Pro Asp Asn Val Thr Ile Ser Asn
 435 440 445
 Gly Asn Asp Asp Gln Ser Gln Leu Lys Asp Asp Arg Gly Asp Ser Pro
 450 455 460
 Asn Lys Ile Leu Ala Asp Asn Lys His Thr Val Asn Asn Lys Thr Leu
 465 470 475 480
 Ser Thr Ala Leu Ala Lys Gly Ile Gly Val Asn Ile Ser Ala Lys Lys
 485 490 495
 Lys Val Asn Val Thr Ala Asp Ile Asn Val His Asn Gly Thr Leu Thr
 500 505
 Leu His Ser Glu Gln Gly Gly Val Glu Ile Asn Gly Asp Ile Thr Ser
 515 520 525
 Glu Gln Asn Gly Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Ser Trp Val Asp Val
 530 535 540
 His Lys Asn Ile Thr Ile Gly Thr Gly Phe Leu Asn Ile Thr Ala Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Val Ala Phe Glu Lys Ala Gly Gly Asp Lys Gly Arg Ala Ala
 565 570 575
 Ser Asp Ala Lys Ile Val Ala Gln Gly Val Ile Thr Ala Gly Ser Gly
 580 585 590
 Gln Asp Phe Arg Phe Asn Asn Val Ser Leu Asn Gly Thr Gly Arg Gly
 595 600 605
 Leu Lys Phe Ile Thr Ala Lys Gly Asn Lys Gly Asn Phe Ser Ala Lys
 610 615 620
 Phe Asp Gly Val Leu Asn Ile Ser Gly Asn Ile Ser Ile Asn His Thr

ES 2 649 370 T3

Val Ala Thr Gly Asp Thr Ile Asp Val Ser Gly Asp Phe Thr Val Gly
885 890 895

Asn Asp Ala Thr Phe Asn Gly Asn Thr Asn Asn Asn Leu Asn Ile Thr
900 905 910

Gly Asn Phe Thr Asn Asn Gly Thr Ser Ile Ile Asp Val Lys Lys Gly
915 920 925

Ala Ala Lys Leu Gly Asn Ile Thr Asn Glu Gly Ser Leu Asn Ile Thr
930 935 940

Thr His Ala Asn Thr Asn Gln Lys Thr Ile Ile Thr Gly Asn Ile Thr
945 950 955 960

Asn Lys Lys Gly Asp Leu Asn Ile Arg Asp Asn Lys Asn Asn Ala Glu
965 970 975

Ile Gln Ile Gly Gly Asn Ile Ser Gln Lys Glu Gly Asn Leu Thr Ile
980 985 990

Ser Ser Asp Lys Val Asn Ile Thr Lys Gln Ile Thr Ile Lys Ala Gly
995 1000 1005

Val Asn Gly Glu Asn Ser Asp Ser Gly Thr Glu Asn Asn Ala Asn
1010 1015 1020

Leu Thr Ile Lys Thr Lys Thr Leu Glu Leu Thr Asn Asn Leu Asn
1025 1030 1035

Ile Ser Gly Phe His Lys Ala Glu Ile Thr Ala Lys Asp Asn Ser
1040 1045 1050

Asp Leu Ile Ile Gly Lys Ala Ser Ser Asp Ser Gly Asn Ala Gly
1055 1060 1065

Ala Gln Lys Val Ile Phe Asp Lys Val Lys Asp Ser Lys Ile Ser
1070 1075 1080

Ala Gly Asn His Asn Val Thr Leu Asn Ser Glu Val Glu Thr Ser
1085 1090 1095

Asn Gly Asn Ser Asn Ala Ala Gly Asp Ser Asn Gly Asn Asn Ala
1100 1105 1110

Gly Leu Thr Ile Ser Ala Lys Asp Val Ala Val Asn Asn Asn Ile
1115 1120 1125

ES 2 649 370 T3

Thr Ser His Lys Thr Ile Asn Ile Ser Ala Thr Thr Gly Asn Val
 1130 1135 1140
 Thr Thr Lys Glu Gly Thr Thr Ile Asn Ala Thr Thr Gly Gly Val
 1145 1150 1155
 Glu Val Thr Ala Lys Thr Gly Asp Ile Lys Gly Gly Ile Glu Ser
 1160 1165 1170
 Lys Ser Gly Gly Val Thr Leu Thr Ala Thr Gly Asp Thr Leu Ala
 1175 1180 1185
 Val Gly Asn Ile Ser Gly Asn Thr Val Ser Val Thr Ala Asn Ser
 1190 1195 1200
 Gly Thr Leu Thr Thr Lys Ala Asp Ser Thr Ile Lys Gly Thr Gly
 1205 1210 1215
 Ser Val Thr Thr Leu Ser Gln Ser Gly Asp Ile Gly Gly Thr Ile
 1220 1225 1230
 Ser Gly Lys Thr Val Ser Val Thr Ala Thr Thr Asp Ser Leu Thr
 1235 1240 1245
 Val Lys Gly Gly Ala Lys Ile Asn Ala Thr Glu Gly Thr Ala Thr
 1250 1255 1260
 Leu Thr Ala Ser Ser Gly Lys Leu Thr Thr Glu Ala Asn Ser Ala
 1265 1270 1275
 Ile Ser Gly Ala Asn Gly Val Thr Ala Ser Ser Gln Ser Gly Asp
 1280 1285 1290
 Ile Ser Gly Thr Ile Ser Gly Lys Thr Val Ser Val Thr Ala Thr
 1295 1300 1305
 Thr Asp Ser Leu Thr Val Lys Gly Gly Ala Lys Ile Asn Ala Thr
 1310 1315 1320
 Glu Gly Thr Ala Thr Leu Thr Ala Ser Ser Gly Lys Leu Thr Thr
 1325 1330 1335
 Glu Ala Ser Ser Ser Ile Thr Ser Ala Lys Gly Gln Val Asp Leu
 1340 1345 1350
 Ser Ala Arg Asp Gly Asn Ile Gly Gly Ser Ile Asn Ala Ala Asn
 1355 1360 1365

Val Thr Leu Asn Thr Thr Gly Thr Leu Thr Thr Val Lys Gly Ser
 1370 1375 1380

Ser Ile Asn Ala Asn Ser Gly Thr Leu Val Ile Asn Ala Glu Asp
 1385 1390 1395

Ala Lys Leu Asp Gly Thr Ala Ser Gly Asp Arg Thr Val Val Asn
 1400 1405 1410

Ala Thr Asn Ala Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Ala Val Thr Ser
 1415 1420 1425

Ser Ser Val Asn Ile Thr Gly Asp Leu Ser Thr Ile Asn Gly Leu
 1430 1435 1440

Asn Ile Ile Ser Lys Asn Gly Lys Asn Thr Val Val Leu Lys Gly
 1445 1450 1455

Ala Glu Ile Asp Val Lys Tyr Ile Gln Pro Gly Val Ala Ser Ala
 1460 1465 1470

Glu Glu Val Ile Glu Ala Lys Arg Ala Leu Glu Lys Val Lys Asp
 1475 1480 1485

Leu Ser Asp Glu Glu Arg Glu Thr Leu Ala Lys Leu Gly Val Ser
 1490 1495 1500

Ala Val Arg Phe Val Glu Pro Asn Asn Ala Ile Thr Val Asn Thr
 1505 1510 1515

Gln Asn Glu Phe Thr Thr Arg Pro Ser Ser Gln Val Thr Ile Ser
 1520 1525 1530

Glu Gly Lys Ala Cys Phe Ser Ser Gly Asp Gly Ala Ala Val Cys
 1535 1540 1545

Thr Asn Val Ala Asp Asp Gly Gln Gln
 1550 1555

<210> 12
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

5

<400> 12

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

ES 2 649 370 T3

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

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

Glu Lys Asn Val Gly Tyr His Arg Asn Ser Phe Thr Tyr Gly Val Phe
 50 55 60

Gly Gly Tyr Gln Ile Leu Asn Gln Asn Asn Leu Gly Leu Ala Val Glu
 65 70 75 80

Leu Gly Tyr Asp Asp Phe Gly Arg Ala Lys Gly Arg Glu Lys Gly Lys
 85 90 95

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

Ser Tyr Glu Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Tyr Gly Lys Ala Gly Val
 115 120 125

Ala Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr
 130 135 140

Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr Ala Arg Ala Ser Gly Leu Phe
 145 150 155 160

Ala Val Gly Ala Glu Tyr Ala Val Leu Pro Glu Leu Ala Val Arg Leu
 165 170 175

Glu Tyr Gln Trp Leu Thr Arg Val Gly Lys Tyr Arg Pro Gln Asp Lys
 180 185 190

Pro Asn Thr Ala Ile Asn Tyr Asn Pro Trp Ile Gly Ser Ile Asn Ala
 195 200 205

Gly Ile Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Gly Ala Ala Pro Val Val Ala Ala
 210 215 220

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

Ala Phe Gly Lys Ala Asn Leu Lys Pro Gln Ala Gln Ala Thr Leu Asp
 245 250 255

Ser Ile Tyr Gly Glu Met Ser Gln Val Lys Ser Ala Lys Val Ala Val

ES 2 649 370 T3

Met Lys Lys Phe Asn Gln Ser Leu Leu Ala Thr Ala Met Leu Leu Ala
 1 5 10 15

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

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

Ala Ser Val Val Ala Thr Asn Pro Ala Leu Met Ser Leu Phe Lys Thr
 50 55 60

Ala Gln Phe Ser Thr Gly Gly Val Tyr Val Asp Ser Arg Ile Asn Met
 65 70 75 80

Asn Gly Asp Val Thr Ser His Ala Thr Ile Val Thr Ser Ser Ser Gly
 85 90 95

Val Arg Ala Ile Lys Asp Gly Ser Ala Ser Ala Arg Asn Val Val Pro
 100 105 110

Gly Ala Phe Val Pro Asn Leu Tyr Phe Val Ala Pro Val Asn Asp Lys

ES 2 649 370 T3

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

ES 2 649 370 T3

Arg Ala Gly Ile Ala Tyr Asp Gln Ala Ala Ser Arg His Gln Arg Ser
370 375 380

Ala Ala Ile Pro Asp Thr Asp Arg Thr Trp Tyr Ser Leu Gly Ala Thr
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Thr Pro Asn Leu Ser Val Asp Leu Gly Tyr Ala Tyr Leu
405 410 415

Lys Gly Lys Lys Val His Phe Lys Glu Val Lys Thr Ile Gly Glu Gln
420 425 430

Arg Ser Leu Thr Phe Asp Thr Thr Ala Asn Tyr Thr Ser Gln Ala His
435 440 445

Ala Asn Leu Tyr Gly Leu Asn Leu Asn Tyr Ser Phe
450 455 460

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de detección de la presencia de bacterias *Haemophilus influenzae* (HiNT) no tipificable en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende las etapas de
- a) recibir una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto; y
 - b) detectar la presencia de al menos un biomarcador en la muestra, en donde el biomarcador es OMP P2 o OMP P5,
- 10 en donde la presencia de al menos un biomarcador indica la presencia de bacterias HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto.
- 15 2. Un método de diagnóstico de infección por *Haemophilus influenzae* (HiNT) no tipificable en el tracto respiratorio superior de un sujeto que comprende las etapas de
- a) recibir una muestra de secreciones del tracto respiratorio superior del sujeto; y
 - b) detectar la presencia de al menos un biomarcador en la muestra, en donde los biomarcadores se seleccionan de OMP P2 o OMP P5,
- 20 en donde la presencia de al menos un biomarcador indica una infección por HiNT en el tracto respiratorio superior del sujeto.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde la muestra se recoge de la nariz o las fosas nasales, cavidad nasal, boca, faringe, cavidad de los senos paranasales o laringe.
4. El método según la reivindicación 3, en donde la muestra se recoge del meato medio.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el biomarcador se detecta usando un anticuerpo específico para OMP P2 o OMP P5.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el sujeto está padeciendo de sinusitis bacteriana.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra se recoge usando hisopos estériles, gasa estéril, lavado nasal, tubo de aspiración o un catéter balón.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el biomarcador se detecta usando un anticuerpo monoclonal.
- 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde un inmunoensayo se usa para detectar el biomarcador.
- 45 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la muestra se recoge con un dispositivo que comprende un sustrato que presenta anticuerpos específicos para los biomarcadores.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el dispositivo es un catéter balón y el sustrato está ensartado en el puerto de aspiración del catéter.

Figura 1

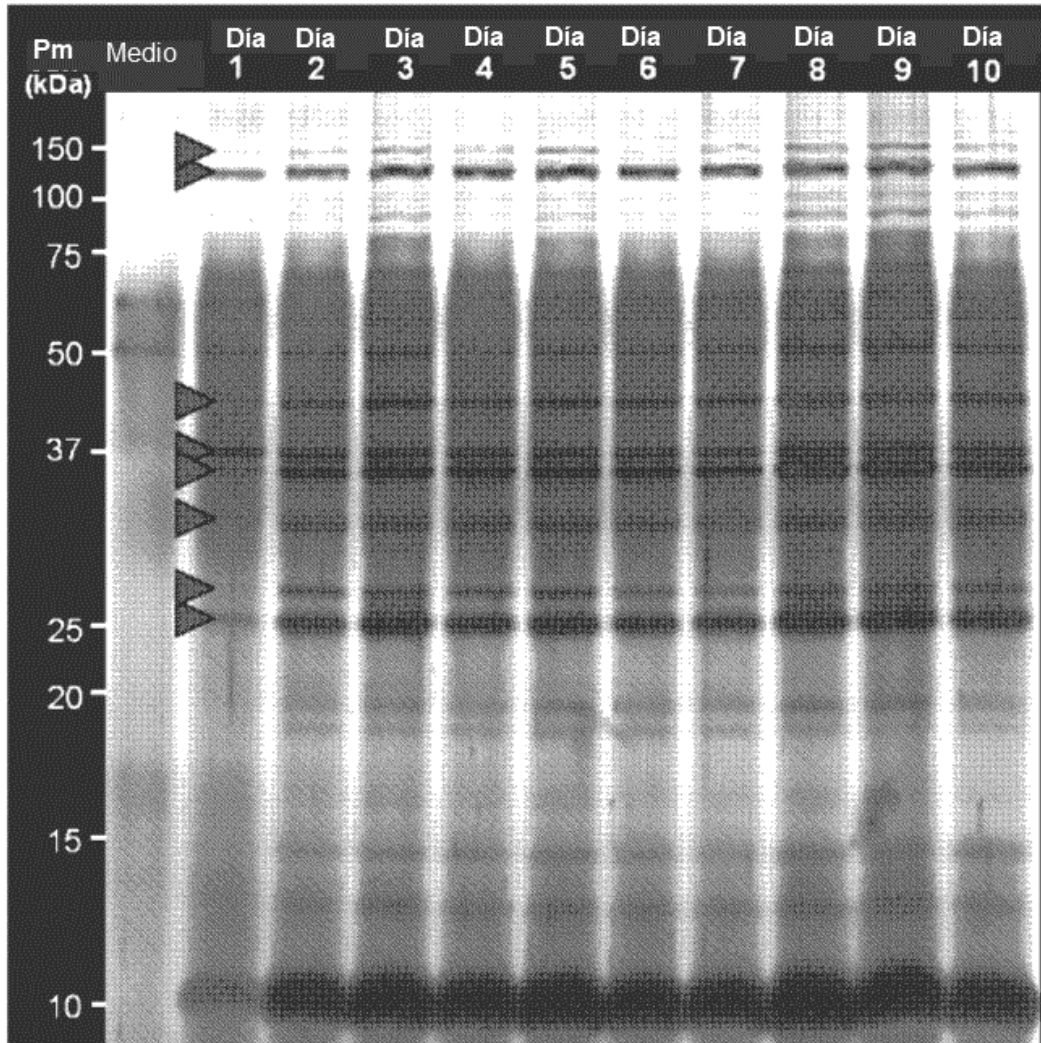


Figura 2

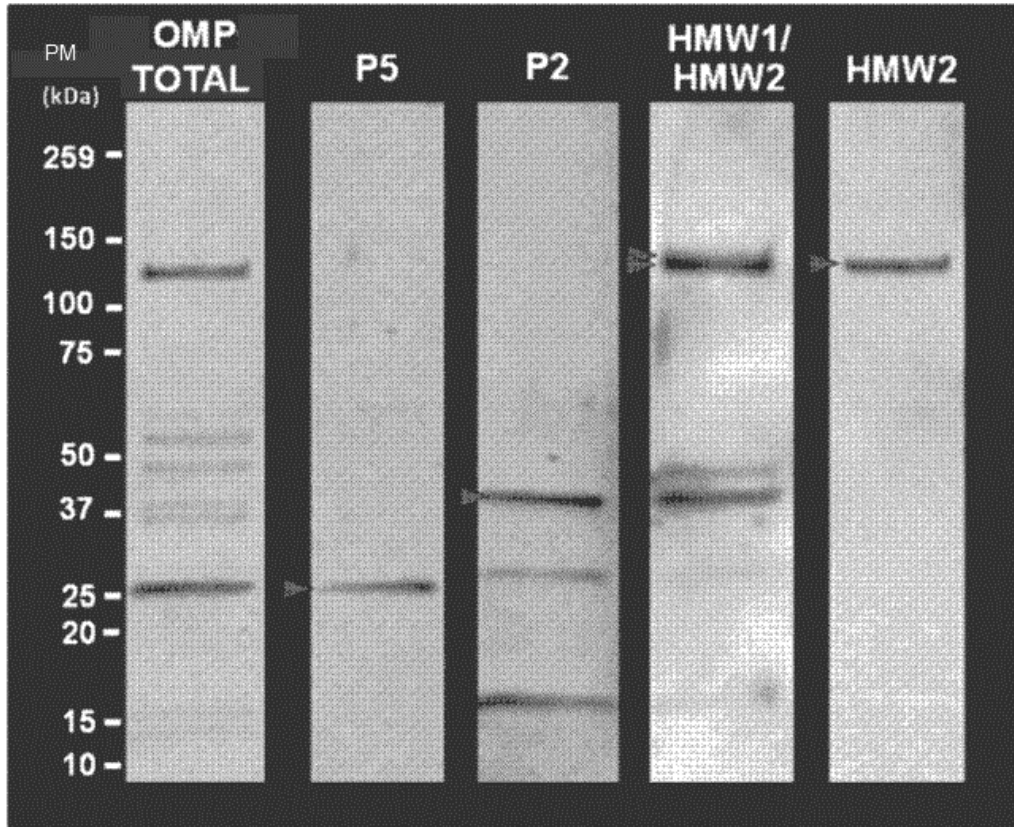


Figura 3

