

(11) Número de Publicação: **PT 1697403 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/285 (2007.10) **C07K 16/12** (2007.10)
G01N 33/50 (2007.10) **A61K 38/16** (2007.10)
A61K 39/102 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2004.12.21**

(30) Prioridade(s): **2003.12.23 US 532296 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.09.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.03.24**
089/2010

(73) Titular(es):

NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL, INC.
700 CHILDREN'S DRIVE COLUMBUS, OH 43205
US

(72) Inventor(es):

LAUREN O. BAKALETZ **US**
ROBERT S. MUNSON **US**

(74) Mandatário:

ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PILI DE TIPO IV DE HAEMOPHILUS INFLUENZAE**

(57) Resumo:

RESUMO

"PILI DE TIPO IV DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*"

A invenção aqui descrita refere-se a um regulão de *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) codificando *pili* de tipo IV. Em particular, a invenção refere-se a *pili* de tipo IV de *H. influenzae* não tipável (NTHi) e de estirpes a, b, c, e, e f de *H. influenzae*. A invenção proporciona polinucleótidos de *pilus* de *H. influenzae* isolados e polipéptidos codificados pelos polinucleótidos, assim como polinucleótidos e polipéptidos codificados pelos polinucleótidos envolvidos no agrupamento/desagrupamento da estrutura. A invenção refere-se também a utilizações destes polinucleótidos e/ou polipéptidos, incluindo métodos para a dedução de uma resposta imunitária contra *H. influenzae* e métodos de tratamento e prevenção de estados patológicos relacionados com *H. influenzae*.

DESCRIÇÃO

"PILI DE TIPO IV DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*"

O trabalho experimental referente à invenção aqui descrita foi suportado pelas bolsas R01 DC03915 e R01 DC005980 do NIH/NIDCD. O governo dos Estados Unidos pode ter determinados direitos na invenção.

Campo da Invenção

A invenção aqui descrita refere-se a um regulão de *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) codificando *pili* de tipo IV. Em particular, a invenção refere-se a *pili* de tipo IV de *H. influenzae* não tipável (NTHi) e de estirpes a, b, c, e, e f de *H. influenzae*. A invenção proporciona polinucleótidos de *pilus* de *H. influenzae* isolados e polipéptidos codificados pelos polinucleótidos, assim como polinucleótidos e polipéptidos codificados pelos polinucleótidos envolvidos no agrupamento/desagrupamento da estrutura. A invenção refere-se, também, a utilizações destes polinucleótidos e/ou polipéptidos, incluindo métodos para a dedução de uma resposta imunitária contra *H. influenzae* e métodos de tratamento e prevenção de estados patológicos relacionados com *H. influenzae*.

Antecedentes

O termo clínico para as infecções do ouvido médio é otite média (OM). De acordo com Klein, *Vaccine*, 19 (Supl. 1): S2-S8, 2000, a OM é a razão mais comum para uma criança doente obter cuidados de saúde e para uma criança nos Estados Unidos receber antibióticos ou submeter-se a um anestésico geral. As estatísticas indicam que em 1990, 24,5 milhões de visitas a consultórios médicos foram realizadas por causa da OM, representando um aumento superior a 200% em relação às aquelas referidas nos anos 1980. Embora raramente associada a mortalidade, a morbilidade associada a OM é significativa. A perda de audição é um problema comum associado a esta doença, frequentemente afectando o comportamento, educação e desenvolvimento de competências de linguagem de uma criança (Baldwin, *Am. J. Otol.*, 14: 601-604, 1993; Hunter *et al.*, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.*, 163: 59-61, 1994; Teele *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 162: 685-694, 1990). O impacto socioeconómico da OM é, também, grande, com custos directos e indirectos de diagnóstico e gestão da OM excedendo 5 mil milhões de dólares anualmente, só nos E.U.A. (Kaplan *et al.*, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 16: S9-11, 1997).

Pensa-se que a OM resulta de factores infecciosos, ambientais e genéticos do hospedeiro. Bactérias, tais como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* são os organismos infecciosos mais comuns em OM. A OM aguda é uma doença caracterizada por rápido começo e curta duração de sinais e sintomas de inflamação no ouvido médio, enquanto a OM crónica refere-se a um estado que é definido pela presença relativamente assintomática de fluido (ou efusão) no ouvido médio. Contudo, na OM crónica, não obstante a ausência de

determinados sinais de infecção aguda (*i. e.*, dor auricular ou febre), estes fluidos anómalos do ouvido médio podem persistir durante períodos excedendo três meses. O tratamento da OM aguda por terapia com antibióticos é comum, porém emergiram bactérias resistentes aos antibióticos. A gestão cirúrgica da OM crônica envolve a inserção de tubos de timpanotomia através da membrana timpânica do ouvido, enquanto uma criança está sob anestesia geral. Embora este processo seja frequente (as taxas de prevalência são ~13%; Bright *et al.*, *Am. J. Public Health*, 83(7): 1026-8, 1993) e seja altamente eficaz em termos de alívio de sintomas dolorosos, por drenagem do ouvido médio de fluidos acumulados, é invasivo e comporta riscos inerentes (Berman *et al.*, *Pediatrics*, 93(3):353-63, 1994; Bright *et al.*, *supra.*; Cimon, *ASM News*, 60: 527-528; Paap, *Ann. Pharmacother.*, 30(11): 1291-7, 1996). Existe, deste modo, uma necessidade para abordagens adicionais à gestão e, de um modo preferido, à prevenção da OM.

O desenvolvimento de vacinas de OM está muito avançado para *S. pneumoniae*, o principal agente causador da OM aguda (AOM), como evidenciado pela recente aprovação e lançamento de uma vacina capsular heptavalente conjugada, PREVNAR® (Eskola e Kilpi, *Pedriatr. Infect. Dis. J.* 16: S72-78, 2000). Embora a PREVNAR® tenha sido altamente eficaz para a doença pneumocócica invasiva, a cobertura para a OM tem sido decepcionante (6-8%), com relatos de um número crescente de casos de OM, em virtude de serotipos não incluídos na vacina (Black *et al.*, *Pedriatr. Infect. Dis J.*, 19: 187-195, 2000; Eskola *et al.*, *Pedriatr. Infect. Dis J.*, 19: S72-78, 2000; Eskola *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 344: 403-409, 2001; Snow *et al.*, *Otol. Neurotol.*, 23: 1-2, 2002).

A *H. influenzae* é uma bactéria gram-negativa que, como notado anteriormente, desempenha um papel na OM. Os isolados clínicos de *H. influenzae* são classificados como serotipos "a" a "f" ou como não tipáveis, dependendo da presença ou ausência, respectivamente, de cápsulas de polissacáridos tipo-específicas nas bactérias. Foi desenvolvida uma vacina para *H. influenzae* de tipo b. Como a Prevnar®, as vacinas de tipo b de *H. influenzae* visam a cápsula de polissacáridos deste organismo e, deste modo, a vacina é compreendida por polissacárido de cápsula que foi conjugado a um veículo de proteína. Foram feitos menos progressos para uma vacina para *H. influenzae* não tipável (NTHi) que causa, aproximadamente, 20% de OM aguda em crianças e predomina em OM crónica com efusão (Coleman et al., *Inf and Immunity*, 59(5), 1716-1722, 1991; Klein, *Pedriatr. Infect. Dis J.*, 16, S5-8, 1997; Spinola et al., *J. Infect. Dis.*, 154, 100-109, 1986). A NTHi pode, também, causar pneumonia, sinusite, septicemia, endocardite, epiglote, artrite séptica, meningite, infecções pós-parto e neonatais, sépsis pós-parto e neonatal, salpingite aguda e crónica, epiglote, *pericardis*, celulite, osteomielite, endocardite, colecistite, infecções intra-abdominais, infecção do aparelho urinário, mastoidite, infecção de enxerto aórtico, conjuntivite, febre purpúrica Brasileira, bacteriemia oculta e exacerbação de doenças pulmonares subjacentes, tais como bronquite crónica, bronquiectasia e fibrose quística. Um isolado de NTHi protótipo é o isolado de baixa passagem, 86-028NP, que foi recuperado de uma criança com OM crónica. Esta estirpe foi bem caracterizada *in vitro* (Bakaletz et al., *Infect. Immun.*, 53: 331-5, 1988; Holmes et al., *Microb. Pathog.*, 23: 1S7-66, 1997), assim como num modelo de OM de chinchila (Bakaletz et al., *Vaccine*, 15: 955-61, 1997; Suzuki et al., *Infect. Immun.*, 62: 1710-8, 1994; DeMaria et al., *Infect. Immun.*, 64: 5187-92, 1996). A estirpe 86-026NP de NTHi

foi depositada na *American Type Culture Collection*, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, a 16 de Outubro de 2001 e atribuído o N° de depósito PTA-4764. Um conjunto *contig* do genoma da estripe 86-028NP pode ser consultado em <http://www.microbial-pathogenesis.org>.

A aderência e colonização são primeiras etapas reconhecidas na patogénese de *H. influenzae*. Como tal, a *H. influenzae* expressa múltiplas adesinas, incluindo *pili* de hemoglutinação, adesinas de fímbria e não fímbricas (Gilsdorf *et al.*, *Pediatr Res* 39, 343-348, 1996; Gilsdorf., *Infect. Immun.*, 65, 2997-3002, 1997; e St. Geme III, *Cell. Microbiol.*, 4, 191-200, 2002). De um modo notável, nenhuma das adesinas descritas foi anteriormente associada a uma função de mobilidade. Além do mais, a *H. influenzae* não expressa flagelos que estão também associados a mobilidade. A mobilidade por contracção e distensão é uma forma, independente de flagelos, de translocação bacteriana sobre superfícies húmidas e ocorre por extensão, imobilização e, depois, retracção de estruturas polares conhecidas como *pili* de tipo IV (Bardy., *Microbiology*, 149, 295-304, 2003; Tonjum e Koomey, *Gene*, 192, 155-163, 1997; Wolfgang *et al.*, *EMBO J.*, 19, 6408-6418; Mattick, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 289-314, 2002). Os *pili* de tipo IV têm, de um modo típico, 5-7 nm de diâmetro, vários micrómetros em comprimento e são compreendidos por uma única subunidade de proteína agrupada numa conformação helicoidal com 5 subunidades por volta (Bardy *et al.*, *Microbiology*, 149, 295-304, 2003; Wall e Kaiser, *Mol. Microbiol.*, 32, 1-10, 1999). As subunidades de pilina de tipo IV têm habitualmente 145-160 aminoácidos de comprimento e podem ser glicosiladas ou fosforiladas. Existem duas classes de subunidades de pilina, tipo IVa e tipo IVb, que são distinguidas entre si pelo comprimento médio do péptido condutor e da

subunidade madura, cujo aminoácido N-metilado ocupa a posição N-terminal da proteína madura e o comprimento médio da região D (para a região dissulfureto). A maioria dos patógenos respiratórios expressa pilinas de classe IVa, enquanto os enteropatógenos expressam, de um modo mais típico, pilinas de classe IVb. Os *pili* de tipo IVa são distinguidos pela presença de uma fenilalanina altamente conservada, hidrófoba, metilada no N-terminal.

Os *pili* de tipo IV servem como um meio de rápida colonização de novas superfícies. Deste modo, a expressão de *pilus* de tipo IV é importante tanto para a aderência como formação de biofilme por muitas bactérias (Mattick, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 289-314 2002; O'Toole e Kolter, *Mol. Microbiol.*, 30, 295-304, 1998; Klausen *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 50, 61-68, 2003; Jesaids *et al.*, *J. Immunol.*, 171, 4329-4339, 2003), assim como virulência de espécies de *Neisseria*, *Moraxella bovis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enteropatogénica e *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras (O'Toole e Kolter, *supra*; Klausen *et al.*, *supra*; Klausen *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 48, 1511-1524, 2003; Strom e Lory, *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 565-596, 1993). Um biofilme é uma complexa organização de bactérias que estão ancoradas a uma superfície por meio de uma matriz de exopolissacárido bacterionalmente extrudido. A matriz envolve as bactérias e protege-as do sistema imunitário humano. Ehrlich *et al.*, *JAMA*, 287(13), 1710-1715 (2002) descrevem a formação de biofilme por *H. influenzae*. Foi postulado que o bloqueio da interacção entre *pili* de tipo IV e o corpo humano pode evitar ou parar a infecção bacteriana (Meyer *et al.*, Patente U.S. Nº 6268171, concedida em 31 de Julho de 2001).

A expressão de *pilus* de tipo IV é uma função bacteriana complexa e altamente regulada. Em *P. aeruginosa*, a biogénese e função de *pili* de tipo IV são controladas por mais de quarenta genes (Strom e Lory, *supra*). Até à data, apenas um subconjunto do vasto número de genes relacionados com *pilus* de tipo IV (Tonjum e Koomey, *supra*; Darzins e Russell, *Gene*, 192, 109-115, 1997) foi verificado em diversos membros da família HAP (*Haemophilus*, *Actinobacillus* e *Pasteurella*) (Stevenson *et al.*, *Vet. Microbiol.*, 92, 121-134, 2003; Doughty *et al.*, *Vet. Microbiol.*, 72, 79-90, 2000; Dougherty e Smith, *Microbiology*, 145, 401-409 1999), porém nem a expressão de *pili* de tipo IV nem a mobilidade por contracção e distensão foram alguma vez descritas para qualquer isolado de *H. influenzae*. De facto, a *H. influenzae* é classicamente descrita como uma bactéria que não expressa estas estruturas (Friedrich *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3695-3700, 2003; Fussenegger *et al.*, *Gene*, 192, 125-134, 1997), não obstante a presença de um aglomerado génico críptico dentro do genoma da estirpe Rd (Fleischmann *et al.*, *Science*, 269, 496-512, 1995). A estirpe Rd é um derivado não encapsulado de um organismo de serotipo d de *H. influenzae* (Zwahlen *et al.*, *Infect. Immun.*, 42, 708-715, 1983; Bendler e Goodgal, *J. Microbiol.*, 70, 411-422, 1972; Risberg *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 261, 171-180, 1999). Embora a estirpe Rd tenha algumas propriedades de virulência, as estirpes de serotipo d são, em geral, consideradas como sendo comensais; as mesmas não causam frequentemente doença (Daines *et al.*, *J. Med Microbiol.*, 52, 277-282, 2003). É, por conseguinte, importante fazer a distinção entre estirpes causadoras de doença de *H. influenzae* e a estirpe Rd.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a aglomerados génicos de *pilus* de Tipo IV de *H. influenzae*, em particular *H. influenzae* não tipável (NTHi) e estirpes a, b, c, e, e f de *H. influenzae*.

Polinucleótidos e Polipéptidos da Invenção

De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção, é proporcionado um polinucleótido isolado, compreendendo uma sequência nucleotídica codificando uma sequência de aminoácidos de qualquer um de: polipéptido Pila da SEQ ID N° 2, polipéptido Pila da SEQ ID N° 26, polipéptido Pila da SEQ ID N° 28, polipéptido Pila da SEQ ID N° 30, polipéptido Pila da SEQ ID N° 32, polipéptido Pila da SEQ ID N° 34, polipéptido Pila da SEQ ID N° 36, polipéptido Pila da SEQ ID N° 38, polipéptido Pila da SEQ ID N° 40, polipéptido Pila da SEQ ID N° 42 ou polipéptido Pila da SEQ ID N° 44.

De acordo com um segundo aspecto da presente invenção, é proporcionado um polinucleótido isolado, compreendendo uma sequência nucleotídica de qualquer um de: *pila* da SEQ ID N° 1, *pila* da SEQ ID N° 25, *pila* da SEQ ID N° 27, *pila* da SEQ ID N° 29, *pila* da SEQ ID N° 31, *pila* da SEQ ID N° 33, *pila* da SEQ ID N° 35, *pila* da SEQ ID N° 37, *pila* da SEQ ID N° 39, *pila* da SEQ ID N° 41 ou *pila* da SEQ ID N° 43.

De acordo com um terceiro aspecto da presente invenção, é proporcionado um vector compreendendo um polinucleótido da presente invenção.

De acordo com um quarto aspecto da presente invenção, é proporcionado um polipéptido isolado, compreendendo uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência nucleotídica do primeiro aspecto da presente invenção.

De acordo com um quinto aspecto da presente invenção, é proporcionado um polipéptido isolado, compreendendo uma sequência de aminoácidos de qualquer um de polipéptido P1A da SEQ ID N° 2, polipéptido P1A da SEQ ID N° 26, polipéptido P1A da SEQ ID N° 28, polipéptido P1A da SEQ ID N° 30, polipéptido P1A da SEQ ID N° 32, polipéptido P1A da SEQ ID N° 34, polipéptido P1A da SEQ ID N° 36, polipéptido P1A da SEQ ID N° 38, polipéptido P1A da SEQ ID N° 40, polipéptido P1A da SEQ ID N° 42 ou polipéptido P1A da SEQ ID N° 44.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um fragmento peptídico isolado do polipéptido da presente invenção, em que o fragmento peptídico deduz uma resposta imunitária contra o polipéptido de pilina de *H. influenzae*.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é proporcionado um fragmento peptídico isolado do polipéptido da presente invenção, em que o fragmento peptídico inibe a aderência celular de *H. influenzae*.

De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um fragmento peptídico isolado do polipéptido da presente invenção, em que o fragmento peptídico compreende:

- (i) aminoácidos 35 a 68 da SEQ ID N° 2;
- (ii) aminoácidos 69 a 102 da SEQ ID N° 2;

- (iii) aminoácidos 103 a 137 da SEQ ID N° 2; ou
- (iv) aminoácidos 21 a 35 da SEQ ID N° 2.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionada uma composição compreendendo um polipéptido da presente invenção ou um fragmento peptídico da presente invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é proporcionado um anticorpo que se liga especificamente a uma sequência de aminoácidos, seleccionada do grupo consistindo em:

- a) a sequência de aminoácidos SEQ ID N° 2,
- b) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 26,
- c) a sequência de aminoácidos de da SEQ ID N° 28,
- d) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 30,
- e) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 32,
- f) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 34,
- g) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 36,
- h) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 38,
- i) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 40,
- j) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 42,
- k) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 44,
- l) aminoácidos 35 a 68 da SEQ ID N° 2,
- m) aminoácidos 69 a 102 da SEQ ID N° 2,
- n) aminoácidos 103 a 137 da SEQ ID N° 2 ou
- o) aminoácidos 21 a 35 da SEQ ID N° 2.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionada uma composição compreendendo um anticorpo da presente invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é proporcionado um método para a detecção de bactérias NTHi numa amostra biológica, compreendendo

- (a) colocação em contacto de um polinucleótido da presente invenção ou um seu fragmento, tendo 15 nucleótidos ou mais, com uma amostra biológica, e
 - (b) detecção da hibridação do polinucleótido dentro da amostra,
- em que a hibridação indica a presença de bactérias NTHi.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um método para a detecção de bactérias NTHi numa amostra biológica, compreendendo

- (a) colocação em contacto de um anticorpo da presente invenção com uma amostra biológica, e
- (b) detecção da ligação do anticorpo dentro da amostra, em que a ligação indica a presença de bactérias NTHi.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é proporcionada a utilização de um ou mais polipéptidos da presente invenção, ou fragmentos peptídicos da presente invenção, para a preparação de um medicamento para a dedução de uma resposta imunitária contra bactérias NTHi.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionada a utilização de um ou mais polinucleótidos do primeiro aspecto da presente invenção, para a preparação de um medicamento para a dedução de uma resposta imunitária contra bactérias NTHi. O polinucleótido pode ser num plasmídeo ou vector viral.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é proporcionada a utilização de um oligonucleótido anti-sentido que inibe a expressão ou actividade de um polipéptido da presente invenção, para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de infecção bacteriana NTHi.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionada a utilização de um anticorpo que inibe a expressão ou actividade de um polipéptido da presente invenção, para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de infecção bacteriana NTHi.

Os medicamentos anteriores podem ser formulados para uma via de administração seleccionada do grupo consistindo em administração parentérica, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, rectal, intranasal, transdérmica, subcutânea, intramuscular ou vaginal.

A infecção bacteriana NTHi pode ser no ouvido médio.

A infecção bacteriana NTHi pode envolver um estado patológico seleccionado do grupo consistindo em otite média, pneumonia, sinusite, septicemia, endocardite, epiglote, artrite séptica, meningite, sépsis, salpingite, epiglote, *pericardis*, celulite, osteomielite, endocardite, colecistite, infecções intra-abdominais, infecção do aparelho urinário, mastoidite, infecção de enxerto aórtico, conjuntivite, febre purpúrica Brasileira, bacteriemia oculta, bronquite crónica, bronquiectasia e fibrose quística.

São descritos polinucleótidos de *H. influenzae* e, particularmente, fases de leitura aberta de um regulão

organizado em aglomerados de dois genes, mais um outro gene. O regulão inclui um gene (*pilA*) que codifica a subunidade principal de um *pilus* de tipo IV de *H. influenzae* até agora não caracterizado. O regulão inclui polinucleótidos de um aglomerado génico codificando os polipéptidos de pilina PilA (subunidade de pilina principal), PilD (peptidase condutora), PilB e PilC (envolvidos no agrupamento/desagrupamento da estrutura de pilina); outro aglomerado génico codificando ComA, ComB, ComC, ComD, ComE e ComF (envolvidos em competência para transformação e expressão de *pilus*); e um gene codificando PilF (requerido para biogénese de *pilus* de tipo IV) (Watson et al., *Gene*, 49: 56, 1996). A presente invenção refere-se ao regulão de *pilus* da estirpe 86-028NP de *H. Influenzae* NTHi.

São descritos polinucleótidos codificando os polipéptidos de pilina de 86-028NP de NTHi expostos nos seguintes SEQ ID N°: polipéptido PilA em SEQ ID N° 2, polipéptido PilB em SEQ ID N° 4, polipéptido PilC em SEQ ID N° 6, polipéptido PilD em SEQ ID N° 8, polipéptido ComA em SEQ ID N° 10, polipéptido ComB em SEQ ID N° 12, polipéptido ComC em SEQ ID N° 14, polipéptido ComD em SEQ ID N° 16, polipéptido ComE em SEQ ID N° 18. Polipéptido ComF em SEQ ID N° 20 e polipéptido PilF em SEQ ID N° 22. A utilização alternativa de codão, está especificamente contemplada pela invenção. São descritos polinucleótidos que compreendem as sequências génicas de 86-028NP de NTHi expostas nos seguintes SEQ ID N° que codificam, respectivamente, os polipéptidos anteriores: *pilA* em SEQ ID N° 1, *pilB* em SEQ ID N° 3, *pilC* em SEQ ID N° 5, *pilD* em SEQ ID N° 7, *comA* em SEQ ID N° 9, *comB* em SEQ ID N° 11, *comC* em SEQ ID N° 13, *comD* em SEQ ID N° 15, *comE* em SEQ ID N° 17, *comF* em SEQ ID N° 19; e *pilF* em SEQ ID N° 21. Cada das sequências

polinucleotídicas inclui três nucleótidos finais representando um codão de terminação.

São também proporcionados polinucleótidos codificando polipéptidos Pila dos isolados clínicos de NTHi 1728MEE, 1729MEE, 3224A, 10548MEE, 1060MEE, 1885MEE, 1714MEE, 1236MEE, 1128MEE e 214NP. As sequências de aminoácidos destes polipéptidos Pila são expostas nos SEQ ID N° 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 e 44, respectivamente. De novo, a possibilidade de utilização de codão alternativa está especificamente contemplada em polinucleótidos codificando os polipéptidos. Numa forma de realização, os polipéptidos são, respectivamente, codificados pelas sequências nucleotídicas expostas na SEQ ID N°: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 e 43.

A invenção proporciona polinucleótidos que hibridam sob condições restritivas a (a) o complemento das sequências nucleotídicas expostas nos SEQ ID N°: 1, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 ou 43; (b) um polinucleótido que é um variante alélico de quaisquer polinucleótidos enumerados anteriormente; (c) um polinucleótido que codifica um homólogo de espécie de qualquer das proteínas enumeradas anteriormente; ou (d) um polinucleótido que codifica um polipéptido compreendendo um domínio específico ou truncamento dos polipéptidos da presente invenção. Estão, especificamente, contemplados os polinucleótidos de pilina de tipo IV de outras estirpes de *H. influenzae* não tipável e de estirpes a, b, c, e, e f de *H. influenzae*. Estes polinucleótidos podem ser identificados e isolados por técnicas padrão na técnica, tais como hibridação e reacção de polimerização em cadeia, utilizando parte ou a totalidade dos polinucleótidos da SEQ ID N°: 1, 25, 27, 29, 31,

33, 35, 37, 39, 41 ou 43 como sondas ou iniciadores, respectivamente.

Os polinucleótidos da invenção incluem também sequências nucleotídicas que são, substancialmente, equivalentes aos polinucleótidos enumerados anteriormente. São descritos polinucleótidos que têm, *e. g.*, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% ou 89%, de um modo mais típico, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93% ou 94% e, de um modo ainda mais típico, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade da SEQuência com os polinucleótidos NTHi enumerados anteriormente.

Estão incluídos dentro do âmbito das sequências de ácidos nucleicos da invenção os fragmentos da SEQuências de ácidos nucleicos que se hibridam sob condições restritivas às sequências nucleotídicas NTHi da SEQ ID N°: 1, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 ou 43, ou seus complementos, cujo fragmento é superior a cerca de 5 nucleótidos, de um modo preferido 7 nucleótidos, de um modo mais preferido, superior a 9 nucleótidos e, de um modo muito preferido, superior a 17 nucleótidos. Estão contemplados os fragmentos de, *e. g.*, 15, 17 ou 20 nucleótidos, ou mais, que são selectivos para (*i. e.*, hibridarem especificamente a qualquer um dos polinucleótidos da invenção). Estes fragmentos da SEQuências de ácidos nucleicos capazes de se hibridarem especificamente a um polinucleótido NTHi da invenção, podem ser utilizados como sondas para detectar polinucleótidos NTHi da invenção e/ou podem diferenciar polinucleótidos NTHi da invenção de outros genes bacterianos e são, de um modo preferido, baseados em sequências nucleotídicas únicas.

O termo "restringente" é aqui utilizado para se referir a condições que são geralmente compreendidas na técnica como restritivas. A estritência de hibridação é determinada principalmente por temperatura, força iónica e a concentração de agentes desnaturantes, tal como formamida. São exemplos de condições restritivas para hibridação e lavagem cloreto de sódio a 0,015 M, citrato de sódio a 0,0015, a 65-68 °C, ou cloreto de sódio a 0,015 M, citrato de sódio a 0,0015 M e formamida a 50%, a 42 °C. Ver Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N. I. 1989).

Podem ser também utilizadas condições mais restritivas (tais como temperatura mais elevada, força iónica mais baixa, formamida mais elevada ou outro agente de desnaturação), contudo, a taxa de hibridação irá ser afectada. Nos casos em que esteja envolvida a hibridação de desoxioligonucleótidos, condições de hibridação restritiva exemplificativas adicionais incluem lavagem em 6X SSC, pirofosfato de sódio a 0,05%, a 37 °C (para oligos de 14 bases), 48 °C (para oligos de 17 bases), 55 °C (para oligos de 20 bases) e 60 °C (para oligos de 23 bases).

Para efeitos de redução de hibridação não específica e/ou de fundo, podem ser incluídos outros agentes na hibridação e tampões de lavagem. São exemplos a albumina de soro bovino a 0.1%, polivinilpirrolidona a 0,1%, pirofosfato de sódio a 0,1%, dodecilssulfato de sódio a 0,1%, NaDodSO₄, (SDS), *ficoll*, solução de Denhardt, ADN de esperma de salmão sonificado (ou outro ADN não complementar) e sulfato de dextrano, embora possam ser, também, utilizados outros agentes adequados. A concentração e tipos destes aditivos podem ser alterados, sem afectar

substancialmente a restringência das condições de hibridação. As experiências de hibridação são habitualmente efectuadas a pH 6,8-7,4, contudo, a condições típicas de força iónica, a taxa de hibridação é quase independente de pH. Ver Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, Cap. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra). As condições de hibridação podem ser ajustadas por um especialista na técnica, para acomodar estas variáveis e permitir que os ADN de diferente parentesco da SEQuência formem híbridos.

Como notado anteriormente, os polinucleótidos contemplados pela presente invenção não estão limitados aos polinucleótidos específicos da SEQ ID N°: 1, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 ou 43 mas incluem também, por exemplo, variações alélicas e de espécie destes. As variações alélicas e de espécie podem ser rotineiramente determinadas por comparação da sequência proporcionada em SEQ ID N°: 1, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 ou 43, de um modo preferido, as fases de leitura aberta nestas, um seu fragmento representativo ou uma sequência nucleotídica pelo menos 90% idêntica, de um modo preferido 95% idêntica, às fases de leitura aberta dentro da SEQ ID N°: 1, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 ou 43 com uma sequência de outro isolado da mesma espécie ou outra espécie. Os métodos de programas informáticos preferidos para determinar a identidade e semelhança entre duas sequências incluem mas não estão limitados ao pacote do programa GCG, incluindo GAP (Devereux *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 12: 387, 1984; *Genetics Computer Group*, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410, 1990). O programa BLASTX está publicamente disponível a partir do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e outras fontes (*BLAST Manual*, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*,

supra). O bem conhecido algoritmo de Smith-Waterman pode ser, também, utilizado para determinar a identidade.

Os polinucleótidos da invenção podem ser isolados de fontes naturais ou podem ser sintetizados por técnicas químicas padrão, e. g., o método do fosfotriéster descrito em Matteucci *et al.*, *J Am Chem Soc.*, 103: 3185 (1981).

São, também, proporcionados polinucleótidos anti-sentido complementares aos polinucleótidos codificando os polipéptidos de *pilus* da invenção.

São descritos os polipéptidos de pilina PilA, PilD, PilB, PilC, ComA, ComB, ComC, ComD, ComE, ComF e PilF. Numa forma de realização, os polipéptidos compreendem a sequência de aminoácidos de 86-028NP de NTHi, exposta em SEQ ID N° 2. Os polipéptidos da invenção incluem, também, polipéptidos PilA expostos em SEQ ID N°: 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 ou 44. Em formas de realização adicionais, os polipéptidos de pilina de Tipo IV da invenção são aqueles de outras estirpes de *H. influenzae* não tipável e de estirpes a, b, c, e, e f de *H. influenzae*.

Os polipéptidos da invenção incluem especificamente fragmentos peptídicos (*i. e.*, péptidos) que retêm uma ou mais propriedades biológicas ou imunogénicas de um polipéptido de comprimento completo da invenção. Numa forma de realização, os fragmentos peptídicos PilA proporcionados pela invenção são designados TfpQ2, TFPQ3, TfpQ4 e OLP3 e compreendem, respectivamente, os aminoácidos 35 a 68 da SEQ ID N° 2, aminoácidos 69 a 102 da SEQ ID N° 2, aminoácidos 103 a 137 da SEQ ID N° 2 e aminoácidos 21 a 35 da SEQ ID N° 2.

São descritos polipéptidos com uma ou mais substituições conservativas de aminoácidos que não afectam a actividade biológica e/ou imunogénica do polipéptido. Alternativamente, são descritos polipéptidos tendo substituições conservativas de aminoácidos que podem ou não alterar a actividade biológica. O termo “substituição conservativa de aminoácido”, refere-se a uma substituição de um resíduo de aminoácido nativo com um resíduo não nativo, incluindo aminoácidos de ocorrência natural e de ocorrência não natural, de modo a que exista pouco ou nenhum efeito sobre a polaridade ou carga do resíduo de aminoácido naquela posição. Por exemplo, uma substituição conservativa resulta da substituição de um resíduo não polar num polipéptido com qualquer outro resíduo não polar. Além disso, qualquer resíduo nativo no polipéptido pode ser, também, substituído com alanina, de acordo com os métodos de “mutagénese de rastreio de alanina”. Os aminoácidos de ocorrência natural são caracterizados com base nas suas cadeias laterais, como se segue: básicos: arginina, lisina, histidina; ácidos: ácido glutâmico, ácido aspártico; polares não carregados: glutamina, asparagina, serina, treonina, tirosina; e não polares: fenilalanina, triptofano, cisteína, glicina, alanina, valina, prolina, metionina, leucina, norleucina, isoleucina. As regras gerais para as substituições de aminoácidos são apresentadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1

Resíduos Originais	Substituições Exemplificativas de Substituições de Aminoácidos	Substituições Preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Glu, Asn	Lys

(continuação)

Resíduos Originais	Substituições Exemplificativas de Substituições de Aminoácidos	Substituições Preferidas
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
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

São descritas variantes dos polipéptidos da presente invenção (e. g., um polipéptido exibindo, pelo menos, cerca de 65%, pelo menos, cerca de 70%, pelo menos, cerca de 75%, pelo menos, cerca de 80%, pelo menos, cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, pelo menos, cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, de um modo típico, pelo menos, cerca de 95%, 96%, 97%, de um modo mais

típico, pelo menos, cerca de 98% ou, de um modo muito típico, pelo menos, cerca de 99% de identidade de aminoácido com um polipéptido da SEQ ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ou 22) que retêm actividade biológica e/ou imunogénica.

A invenção contempla que os polinucleótidos da invenção podem ser inseridos num vector para amplificação ou expressão. Para expressão, os polinucleótidos são operativamente ligados a sequências de controlo de expressão apropriadas, tais como sequências promotoras e sinais de poliadenilação. São adicionalmente proporcionadas células hospedeiras compreendendo polinucleótidos da invenção. As células hospedeiras procarióticas exemplificativas incluem bactérias, tais como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Serratia*. Estão especificamente contemplados os métodos de produção de polipéptidos da invenção por cultivo das células hospedeiras e isolamento de polipéptido das células hospedeiras ou meio de crescimento. Podem ser expressos um ou mais polinucleótidos do regulão de *pilus* numa célula hospedeira. Por exemplo, a expressão apenas do gene *pilA* e a expressão de múltiplos polinucleótidos a partir do regulão de *pilus*, para afectar o agrupamento da estrutura de *pili* nativa, estão ambas especificamente contempladas. Alternativamente, os polipéptidos da invenção podem ser preparados por síntese química utilizando meios padrão. São particularmente convenientes as técnicas de fase sólida (ver, e. g., Erikson et al., *The Proteins* (1976) v. 2, Academic Press, Nova Iorque, p. 255). Estão comercialmente disponíveis sintetizadores de fase sólida automatizados. Adicionalmente, são facilmente preparadas modificações na sequência por substituição, adição ou omissão de resíduos apropriados. Por exemplo, um resíduo de cisteína pode ser adicionado à extremidade carboxílica, de modo a proporcionar um

grupo sulfidrílo para ligação conveniente a uma proteína veículo ou elementos espaçadores, tal como um resíduo de glicina adicional, podem ser incorporados dentro da sequência entre o aminoácido de ligação na extremidade C e o restante do péptido.

O termo “isolado” refere-se a uma substância removida e, essencialmente livre, dos outros componentes do ambiente em que naturalmente existe. Por exemplo, um polipéptido está separado de outras proteínas celulares ou um ADN está separado de outro ADN flanqueando-o num genoma em que ocorre naturalmente.

Anticorpos

A invenção proporciona anticorpos que se ligam a epitopos antigénicos únicos de (i. e., são específico para) polipéptidos de pilus de *H. influenzae* da invenção. Em algumas formas de realização, os anticorpos ligam-se a epitopos antigénicos comuns entre múltiplos subtipos de *H. influenzae* mas únicos com respeito a quaisquer outros epitopos antigénicos. Os anticorpos podem ser anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpos que retêm a sua capacidade para se ligarem ao seu epitopo único (e. g., fragmentos Fv, Fab e F(ab)2), anticorpos de cadeia simples e anticorpos humanos ou humanizados. Os anticorpos podem ser produzidos por técnicas padrão na técnica, utilizando polipéptido(s) de pilina da invenção ou células hospedeiras expressando polipéptido(s) de pilina da invenção como antígenos.

Em algumas formas de realização, os anticorpos específicos para os polipéptidos de pilina da presente invenção e os seus fragmentos, exibem a capacidade para provocar a morte a

bactérias *H. influenzae* ou para protegerem os humanos de infecção. Noutras formas de realização, os anticorpos específicos para os polipéptidos da invenção reduzem a virulência, inibem a aderência, inibem a formação de biofilme, inibem a mobilidade por contracção e distensão, inibem a divisão celular e/ou inibem a penetração dentro do epitélio de bactérias *H. influenzae* e/ou melhoram a fagocitose das bactérias *H. influenzae*.

Sistemas *in vitro* de ensaio bactericida mediado por complemento (Musher *et al.*, *Infect. Immun.* 39: 297-304, 1983; Anderson *et al.*, *J Clin. Invest.* 51: 31-38, 1972) podem ser utilizados para medir a actividade bactericida de anticorpos anti-pilus.

É também possível conferir protecção de curto prazo a um hospedeiro por imunoterapia passiva, por meio da administração de anticorpos pré-formados contra um polipéptido de *H. influenzae* da invenção. Deste modo, os anticorpos da invenção podem ser utilizados em imunoterapia passiva. A imunoglobulina humana é preferida em medicina humana, em virtude de uma imunoglobulina heteróloga poder provocar uma resposta imunitária contra os seus componentes imunogénicos estranhos. Tal imunização passiva poderia ser utilizada numa base de emergência para protecção imediata de indivíduos não imunizados submetidos a riscos especiais.

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados na produção de anticorpo anti-idiotípico que, por sua vez, pode ser utilizado como um antigénio para estimular uma resposta imunitária contra epitopos de pilina.

Métodos para a Dedução de uma Resposta Imunitária e Respectivas Composições

A invenção contempla métodos de dedução, num indivíduo, de uma resposta imunitária contra um ou mais polipéptidos de *pilus* de tipo IV de *H. influenzae*. Em determinadas formas de realização, os métodos deduzem uma resposta imunitária contra a proteína PilA. Estes métodos deduzem uma ou mais respostas imunitárias, incluindo mas não limitadas a respostas imunitárias que inibem a replicação bacteriana, respostas imunitárias que bloqueiam a aderência de *H. influenzae* a células, respostas imunitárias que previnem a contracção e distensão de *H. influenzae* e respostas imunitárias que previnem a formação de biofilme. Numa forma de realização, os métodos compreendem uma etapa de administração de uma dose imunogénica de uma composição, compreendendo um ou mais polipéptidos da invenção. Noutra forma de realização, os métodos compreendem a administração de uma dose imunogénica de uma composição, compreendendo uma célula expressando um ou mais polipéptidos da invenção. Ainda noutra forma de realização, os métodos compreendem a administração de uma dose imunogénica de uma composição, compreendendo um ou mais polinucleótidos codificando um ou mais polipéptidos da invenção. O polinucleótido pode ser um polinucleótido livre, não associado a qualquer outro ácido nucleico, ou pode estar num vector, tais como um plasmídeo ou vector viral (e. g., vector de vírus adeno-associado ou vector de adenovírus). Os métodos podem ser utilizados em combinação num único indivíduo. Os métodos podem ser utilizados antes ou a seguir a infecção por *H. influenzae* de um indivíduo.

Numa forma de realização de métodos da invenção, uma composição da invenção é administrada como uma dose de

imunização primária, seguida de uma ou mais doses de reforço. Está, também, contemplada a co-administração de proteínas ou polipéptidos que, de um modo benéfico, melhoram a resposta imunitária, tais como citocinas (e. g., IL-2, IL-12, GM-CSF), moléculas de indução de citocinas (e. g., Leaf) ou moléculas co-estimuladoras.

Uma “dose imunogénica” de uma composição da invenção é aquela que gera, após administração, uma resposta imunitária humoral (anticorpo) e/ou celular (célula T) detectável, em comparação com a resposta imunitária detectável antes de administração ou em comparação com uma resposta imunitária padrão antes de administração. A invenção contempla que a resposta imunitária resultando dos métodos pode ser protectora e/ou terapêutica. Numa forma de realização preferida, a resposta imunitária de anticorpo e/ou célula T protege o indivíduo de infecção por *H. influenzae*, particularmente infecção do ouvido médio e/ou da nasofaringe ou via respiratória inferior. Nesta utilização, a dose precisa depende do estado de saúde e peso do doente, do modo de administração, da natureza da formulação, etc., mas, em geral, varia entre cerca de 1,0 µg e cerca de 5000 µg, por doente de 70 quilogramas, de um modo mais geral, de cerca de 10 a cerca de 500 µg, por 70 kg de peso corporal.

A resposta imunitária humoral pode ser medida por muitos métodos bem conhecidos, tais como Ensaio de Imunodifusão Radial Simples (SRID), Imunoensaio Enzimático (EIA) e Ensaio de Inibição de Hemaglutinação (HAI). Em particular, o SRID utiliza uma camada de um gel, tal como agarose, contendo o imunogénio a ser testado. É cortado um poço no gel e o soro a ser testado é colocado no poço. A difusão do anticorpo para fora, dentro do gel, conduz à formação de um anel de precipitação, cuja área é

proporcional à concentração do anticorpo no soro a ser testado. O EIA, também conhecido por ELISA (Imunoensaio Enzimático), é utilizado para determinar anticorpos totais na amostra. O imunogénio é adsorvido à superfície de uma placa de microtitulação. O soro de teste é exposto à placa, seguido de uma imunoglobulina ligada a enzima, tal como IgG. A actividade enzimática aderente à placa é quantificada por qualquer meio conveniente, tal como espectrofotometria e é proporcional à concentração de anticorpo dirigido contra o imunogénio presente na amostra de teste. O HAI utiliza a capacidade de um imunogénio, tal como proteínas virais, para aglutinar glóbulos vermelhos de galinha (ou semelhantes). O ensaio detecta anticorpos neutralizantes, i. e., aqueles anticorpos capazes de inibirem a hemaglutinação. As diluições do soro de teste são incubadas com uma concentração padrão de imunogénio, seguida da adição dos glóbulos vermelhos. A presença de anticorpos neutralizantes irá inibir a aglutinação dos glóbulos vermelhos pelo imunogénio. Os testes para medir a resposta imunitária celular incluem a determinação de hipersensibilidade de tipo retardado ou medição da resposta proliferativa de linfócitos contra imunogénio alvo.

A invenção proporciona, consequentemente, composições adequadas para a dedução de uma resposta imunitária contra polipéptidos de *pilus* da invenção. Como notado anteriormente, as composições compreendem um ou mais polipéptidos de *pilus*, células expressando um ou mais polipéptidos ou um ou mais polinucleótidos codificando um ou mais polipéptidos de *pilus*. As composições podem compreender, também, outros ingredientes, tais como veículos e adjuvantes.

Em composições da invenção, um polipéptido de *pilus* pode ser fundido a outra proteína quando produzido por métodos recombinantes. Numa forma de realização, a outra proteína pode não, por si só, deduzir anticorpos, mas estabiliza a primeira proteína e forma uma proteína de fusão retendo actividade imunogénica. Noutra forma de realização, a proteína de fusão compreende outra proteína que é imunogénica, tais como Glutathione-S-transferase (GST) ou beta-galactosidase, co-proteínas relativamente grandes que solubilizam a proteína de fusão e facilitam a sua produção e purificação. A outra proteína pode actuar como um adjuvante, no sentido em que proporciona uma estimulação generalizada do sistema imunitário. A outra proteína pode ser fundida à extremidade amino ou carboxílica da proteína NTHi da invenção.

Noutras composições da invenção, os polipéptidos de *pilus* podem ser de outro modo ligados a substâncias veículos. Pode ser utilizado qualquer método de criação de tais ligações conhecido na técnica. As ligações podem ser formadas com agentes heterobifuncionais que produzem uma ligação dissulfureto numa extremidade do grupo funcional e uma ligação peptídica na outra, tal como um agente de formação de dissulfureto amida, e. g., N-succidimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Ver, e. g., Jansen et al., *Immun. Rev.* 62: 185, 1982) e agentes de ligação bifuncionais que formam um tioéter, em vez de uma ligação dissulfureto, tais como ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocapróico, ácido 2-bromoacético, ácido 2-iodoacético, ácido 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxílico e semelhantes, e agente de ligação que activa grupos carboxílicos por combinação dos mesmos com succinimida ou ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, para sal de sódio, tal como

succinimidil 4-(N-maleimido-metil) ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC).

Os polipéptido de *pilus* podem ser formulados como formas neutras ou salinas. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição ácida (formados com os grupos amino livres do péptido) e que são formados com sais inorgânicos, tais como, e. g., ácidos clorídrico ou fosfórico ou ácidos orgânicos, tais como acético, oxálico, tartárico, mandélico. Os sais formados com os grupos carboxilo livres podem ser também derivados de bases inorgânicas, tais como, e. g., sódio, potássio, amónio, cálcio ou hidróxidos férricos e bases orgânicas, tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina e procaína.

As composições da invenção podem compreender adicionalmente adjuvantes. Adjuvantes conhecidos incluem, por exemplo, emulsões, tais como Adjuvantes de Freund e outras emulsões de óleo, *Bordetella pertussis*, MF59, saponina purificada de *Quillaja saponaria* (QS21), sais de alumínio, tais como hidróxido, fosfato e alúmen, fosfato de cálcio, (e outros sais metálicos), géis, tais como sais de hidróxido de alumínio, produtos micobacterianos, incluindo dipéptidos de muramilo, materiais sólidos, partículas, tais como lipossomas e virossomas. Exemplos de produtos naturais e bacterianos, conhecidos como sendo utilizados como adjuvantes, incluem lípido A monofosforilo (MPL), RC-529 (monossacárido acilado sintético semelhante a MPL), OM-174 que é um derivado de lípido A de *E. coli*, holotoxinas, tais como toxina da cólera (CT) ou um dos seus derivados, toxina da tosse convulsa (PT) e toxina termoinstável (LT) de *E. coli* ou um dos seus derivados e oligonucleótidos CpG. A actividade de adjuvante pode ser

afectada por um determinado número de factores, tais como efeito de veículo, formação de depósito, recirculação de linfócito alterada, estimulação de linfócitos T, estimulação directa de linfócitos B e estimulação de macrófagos.

As composições da invenção são, de um modo típico, formuladas como injectáveis, como soluções ou suspensões líquidas; podem ser, também, preparadas formas sólidas adequadas para solução, ou suspensão, em líquido, antes de injeção. A preparação pode ser também emulsionada. O ingrediente imunogénico activo é, frequentemente, misturado com excipientes que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo. São excipientes adequados, e. g., água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e as suas combinações. Adicionalmente, se desejado, a vacina pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes de tamponização de pH, ou adjuvantes que melhoram a eficácia da vacina. As vacinas são administradas, de um modo convencional, parentericamente, por injeção, por exemplo, subcutaneamente ou intramuscularmente.

Formulações adicionais que são adequadas para outros modos de administração incluem supositórios e, em alguns casos, formulações orais. Para supositórios, os aglutinantes e transportadores tradicionais podem incluir, por exemplo, polialquilenoglicóis ou triglicéridos; tais supositórios podem ser formados a partir de misturas contendo o ingrediente activo na gama de 0,5% a 10%, de um modo preferido, 1-2%. As formulações orais incluem excipientes normalmente empregues, tais como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarinato de sódio, celulose,

carbonato de magnésio e semelhantes. Estas composições tomam a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações ou pós de libertação prolongada e contêm 10%-95% de ingrediente activo, de um modo preferido 25-70%.

As composições podem ser, também, administradas através de vias transdérmicas utilizando injectores de jacto, microagulhas, electroporação, sonoporação, microencapsulação, polímeros ou lipossomas, vias transmucosais e vias intranasais utilizando nebulizadores, aerossóis e pulverizadores nasais. A microencapsulação utilizando polímeros naturais ou sintéticos, tais como amido, alginato e quitosano, D-poli-L-lactato (PLA), microsferas de D-poli-DL-láctico-coglicólico, policaprolactonas, poliortoésteres, polianidridos e polifosfazenos polifosfatazanos são úteis para administração transdérmica e transmucosal. Os complexos poliméricos compreendendo poli-ornitina sintético, poli-lisina e poli-arginina ou péptidos anfifílicos são úteis para sistemas de distribuição transdérmica. Adicionalmente, em virtude da sua natureza anfifílica, os lipossomas estão contemplados para sistemas de distribuição de vacinas transdérmicas, transmucosais e intranasais. Os lípidos comuns utilizados para distribuição de vacina incluem sulfato de N-(1,2,3-(dioleil-di-hidroxipropil)-N,N,N-trimetilamónio-metilo (DOTAP), cloreto de dioleiloxi-propil-trimetilamónio DOTMA, amónio de dimetiloxipropil-3-dimetil-hidroxietilo (DMRIE), brometo de dimetildiocadecilo de amónio (DDAB) e 9N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoílo)colesterol (DC-Chol). A combinação de lípidos auxiliares e lipossomas irá melhorar a absorção dos lipossomas através da pele. Estes lípidos auxiliares incluem, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilaurooilfosfatidiletanolamina (DLPE), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE). Adicionalmente,

glicósidos triterpenóides ou saponinas derivados da casca da árvore do sabão Chilena (*Quillaja saponaria*) e quitosano (quitano desacetilado) foram contemplados como adjuvantes úteis para a distribuição de vacina intranasal e transmucosal.

As formulações podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou multidoses, por exemplo, ampolas seladas e frasquinhos de vidro e podem ser armazenados num estado liofilizado, requerendo apenas a adição do transportador líquido estéril, imediatamente antes de utilização.

Métodos de Inibição de *H. influenzae*

Alternativamente, a invenção inclui métodos de inibição da função de *pili* de tipo IV de *H. influenzae* num indivíduo. Os métodos compreendem a administração a um indivíduo, por exemplo, de um ou mais anticorpos da invenção; um ou mais polipéptidos da invenção; um ou mais polinucleótidos anti-sentido da invenção; e/ou um ou mais moléculas de ARNi; numa quantidade que inibe a função dos *pili*. Os ensaios *in vitro* podem ser utilizados para demonstrar a capacidade para inibir a função dos *pili*. As formas de realização destes métodos incluem, por exemplo, métodos utilizando inibidores da síntese de polipéptidos de *pilus* e/ou agrupamento de *pilus*, inibidores de aderência mediada por meio de *pili* de tipo IV, inibidores que dissociam biofilmes existentes mediados por *pili* de tipo IV e inibidores de contracção e distensão.

A inibição está contemplada para qualquer estado patológico envolvendo *H. influenzae*, por exemplo, OM, pneumonia, sinusite, septicemia, endocardite, epigloteite, artrite séptica, meningite,

infecções pós-parto e neonatais, sépsis pós-parto e neonatal, salpingite aguda e crónica, epiglote, *pericardis*, celulite, osteomielite, endocardite, colecistite, infecções intra-abdominais, infecção do aparelho urinário, mastoidite, infecção de enxerto aórtico, conjuntivite, febre purpúrica Brasileira, bacteriemia oculta e exacerbação de doenças pulmonares subjacentes, tais como bronquite crónica, bronquiectasia e fibrose quística.

São proporcionadas composições compreendendo inibidores da função de *pili* de tipo IV de *H. influenzae*. As composições podem consistir num dos ingredientes activos anteriores, podem compreender combinações dos ingredientes activos anteriores ou podem compreender ingredientes activos adicionais utilizados para tratar infecções bacterianas. Como discutido anteriormente, as composições podem compreender um ou mais ingredientes adicionais, tal como veículos farmacêuticamente eficazes. Também como discutido anteriormente, a dosagem e frequência da administração das composições são determinadas por técnicas padrão e dependem, por exemplo, do peso e idade do indivíduo, da via de administração e da gravidade dos sintomas. A administração das composições farmacêuticas pode ser por vias padrão na técnica, por exemplo, parentérica, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, rectal, intranasal ou vaginal.

Modelo Animal

Os métodos da invenção podem ser demonstrados num modelo de chinchila, largamente aceite como um modelo experimental para a OM. Em particular, um modelo de chinchila de OM induzida por NTHi foi bem caracterizado (Bakaletz *et al.*, *J. Infect. Dis.*,

168: 865-872, 1993; Bakaletz e Holmes, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 4: 223-225, 1997; Suzuki e Bakaletz, *Infect. Immun.*, 62: 1710-1718, 1994; Mason et al., *Infect. Immun.*, 71:3454-3462, 2003) e foi utilizado para determinar a eficácia protectora de diversas proteínas de membrana externa de NTHi, combinações de proteínas de membrana externa, componentes de vacina de péptidos sintéticos quiméricos e formulações de adjuvantes contra a OM (Bakaletz et al., *Vaccine*, 15: 955-961, 1997; Bakaletz et al., *Infect. Immun.*, 67: 2746-2762, 1999; Kennedy et al., *Infect. Immun.*, 68: 2756-2765, 2000; Kyd et al., *Infect. Immun.*, 66:2272-2278, 2003; Novotny e Bakaletz, *J. Immunol.*, 171, 1978-1983, 2003).

No modelo, o adenovírus predispõe as chinchilas à OM média induzida por *H. influenzae*, que permitiu o estabelecimento de sistemas relevantes de cultura de células, tecidos e órgãos para a avaliação biológica de NTHi (Bakaletz et al., *J. Infect. Dis.*, 168: 865-72, 1993; Suzuki et al., *Infect. Immunity* 62: 1710-8, 1994). Só a infecção de adenovírus foi utilizada para avaliar a transudação de anticorpos séricos induzidos dentro do tímpano (Bakaletz et al., *Clin. Diagnostic Lab Immunol.*, 4(2): 223-5, 1997) e foi utilizada como um co-patógeno com NTHi, de modo a determinar a eficácia protectora de diversos regimes de imunização activa e passiva visando diversas proteínas de membrana externa de NTHi, combinações de OMP, componentes de vacina de péptidos sintéticos quiméricos e formulações de adjuvantes como vacinogénios contra a otite média (Bakaletz et al., *Infect Immunity*, 67(6): 2746-62, 1999; Kennedy et al., *Infect. Immun.*, 68(5): 2756-65, 2000; Novotny et al., *Infect Immunity* 68(4): 2119-28, 2000; Poolman et al., *Vaccine* 19 (Supl. 1): S108-15, 2000).

Métodos de Detecção de bactérias *H. influenzae*

São, também, proporcionados pela invenção métodos para a detecção de bactérias num indivíduo. Numa forma de realização, os métodos compreendem a detecção de polinucleótidos de *pili* da invenção numa amostra biológica, utilizando iniciadores ou sondas que se ligam, especificamente, aos polinucleótidos. A detecção do polinucleótido pode ser realizada por numerosas técnicas de rotina na técnica envolvendo, por exemplo, hibridação e/ou PCR. Noutra forma de realização, os métodos compreendem a detecção de polipéptidos de *pili* da invenção numa amostra biológica, utilizando anticorpos da invenção que se ligam, especificamente, aos polipéptidos. Os anticorpos podem ser utilizados em qualquer sistema de imunoensaio conhecido na técnica, incluindo mas não limitado a radioimunoensaios, ensaios ELISA, ensaios sanduíche, reacções de precipitina, reacções de precipitina de difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, imunoensaios fluorescentes, imunoensaios de proteína A e ensaios de imunoelectroforese. As amostras biológicas a serem utilizadas nos métodos incluem mas não estão limitadas a sangue, soro, fluido auricular, fluido espinal, esputo, urina, fluido linfático e fluido cerebrospinal.

Breve Descrição do Desenho

A Figura 1 é um alinhamento da SEQuências de aminoácidos dos polipéptidos Pila de NTHi Rd, 86-028NP (SEQ ID N° 2), 1728MEE (SEQ ID N° 26), 1729MEE (SEQ ID N° 28), 3224A (SEQ ID N° 30), 10548MEE (SEQ ID N° 32), 1060MEE (SEQ ID N° 34),

1885MEE (SEQ ID N° 36), 1714MEE (SEQ ID N° 38), 1236MEE (SEQ ID N° 40), 1128MEE (SEQ ID N° 42), 214NP (SEQ ID N° 44).

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos seguintes ilustram a invenção, em que o Exemplo 1 descreve sequências de genes de *pilus* de tipo IV da estirpe 86-028NP de NTHi e detecção do gene *pilA* em treze isolados clínicos de *H. influenzae*, o Exemplo 2 demonstra a formação de agregado dependente de *pilus* de tipo IV clássico pela estirpe 86-028NP de NTHi, o Exemplo 3 demonstra a mobilidade por contracção e distensão na estirpe 86-028NP de NTHi, o Exemplo 4 descreve a observação de *pili* de tipo IV na estirpe 86-928NP de NTHi por coloração negativa e microscopia electrónica de transmissão, o Exemplo 5 descreve a produção de um mutante *pilA*, o Exemplo 6 descreve experiências num modelo de chinchila de infecção com NTHi e mutante *pilA* de NTHi, o Exemplo 7 descreve genes *pilA* de dez isolados clínicos de NTHi, o Exemplo 8 descreve experiências demonstrando uma resposta imunitária contra *pilli* de NTHi em crianças e o Exemplo 9 descreve a identificação de fragmentos peptídicos de NTHi para utilização como imunogénios.

Exemplo 1

Um regulão de *pilus* de tipo REV foi identificado num isolado de OM de NTHi.

Muitas estirpes de NTHi, incluindo a estirpe 86-028NP, não possuem o locus *hif* requerido para a expressão de *pili* LKP de

hemaglutinação (Mhlanga-Mutangadura *et al.*, *J. Bacteriol.*, 180(17), 4693-4703, 1988), contudo a maioria forma biofilmes. Em virtude de os *pili* serem importantes para a formação de biofilme em outros sistemas bacterianos, o conjunto *contig* do esforço da SEQuenciação genómica da estirpe 86-028NP de NTHi (ver <http://www.microbial-pathogenesis.org> ou de patente U.S. Nº 60/453134) em co-propriedade foi analisado para os genes potencialmente codificando outro tipo de *pilus*. O conjunto de dados foi submetido ao BLAST, utilizando o algoritmo *tblasn*, com parâmetros predefinidos, utilizando as proteínas de *Pseudomonas aeruginosa* anotadas como relacionadas com *pilus* de tipo IV ou mobilidade por contracção e distensão para *P. aeruginosa*, incluindo PilQ e PilT em www.Pseudomonas.com. O polipéptido traduzido para a proteína PilA de *P. multocida* foi também utilizado nesta busca (Doughty *et al.*, *Vet. Microbiol.*, 72, 79-90, 2000).

Foi identificado o que inicialmente parecia ser um locus génico de *pilus* de tipo IV críptico. Especificamente, na estirpe 86-028NP, existem quatro genes que são altamente homólogos àqueles na estirpe Rd de *H. influenzae*, *A. pleuropneumoniae* e *P. multocida* (Stevenson *et al.*, *Vet. Microbiol.*, 92, 121-134, 2003; Doughty *et al.*, *supra*; Zhang *et al.*, *FEMS Microbiol Lett*, 189, 15-18, 2000; e Ruffolo *et al.*, *Infect. Immun.*, 65, 339-343, 1997). Estes genes codificam PilA, PilB, PilC e PilD na estirpe Rd (Dougherty e Smith, *Microbiology*, 145(2), 401-409, 1999).

O regulão da estirpe 86-028NP de NTHi inclui um aglomerado génico de polinucleótidos codificando os polipéptidos de pilina PilA (subunidade de pilina principal), PilD (peptidase condutora), PilB e PilC (contemplados como sendo transcritos a partir do mesmo ARNm e como estando envolvidos no

agrupamento/desagrupamento da estrutura de pilina); um aglomerado gênico de polinucleótidos codificando os polipéptidos de pilina ComA, ComB, ComC, ComD, ComE e ComF (envolvidos em competência para transformação e expressão de *pilus*); e outro gene codificando PilF (requerido para biogênese de *pilus* de tipo IV). A sequência de aminoácidos dos polipéptidos de pilina expostos nos seguintes SEQ ID N°: Pila em SEQ ID N° 2, PilB em SEQ ID N° 4, PilC em SEQ ID N° 6, PilD em SEQ ID N° 8, ComA em SEQ ID N° 10, ComB em SEQ ID N° 12, ComC em SEQ ID N° 14, ComD em SEQ ID N° 16, ComE em SEQ ID N° 18, ComF em SEQ ID N° 20 e PilF em SEQ ID N° 22. As sequências gênicas codificando os polipéptidos são expostas nas seguintes SEQ ID N° que codificam, respectivamente, os anteriores polipéptidos: *pilA* em SEQ ID N° 1, *pilB* em SEQ ID N° 3, *pilC* em SEQ ID N° 5, *pilD* em SEQ ID N° 7, *comA* em SEQ ID N° 9, *comB* em SEQ ID N° 11, *comC* em SEQ ID N° 13, *comD* em SEQ ID N° 15, *comE* em SEQ ID N° 17, *comF* em SEQ ID N° 19; e *pilF* em SEQ ID N° 21. Cada das sequências polinucleotídicas inclui três nucleótidos finais representando um codão de terminação.

Em estudos de perfil de expressão gênica, empregando micromatrizes de ADNc para caracterizar a regulação de genes de NTHi durante o desenvolvimento de competência (*i. e.*, a capacidade natural de NTHi para absorver ADN estranho potencialmente melhorando ou expandindo a sua diversidade genética), os genes *com*, assim como os genes *pil*, são regulados positivamente durante o desenvolvimento de competência.

Numa experiência de transferência de Southern, utilizando sequências *pilA* como uma sonda, treze isolados clínicos de OM de baixa passagem de NTHi, recuperados de doentes sofrendo timpanotomia e inserção de tubo para otite média crônica e um

isolado clínico recuperado de um doente com fibrose quística tinham uma única cópia de *pilA* dentro do seu genoma. Estes catorze isolados totais foram designados pelos seguintes números de estirpe, respectivamente: 86-028NP; 1728MEE; 1729MEE; 1714MEE; 214NP; 1236MEE; 165NP; 1060MEE; 1128MEE; 10548MEE; 3224A; 3185A, 1885MEE e 27W11679INI.

Na experiência, o ADN cromossómico bacteriano foi isolado utilizando um kit de isolamento de ADN, PUREGENE, da Gentra Systems (Minneapolis, MN), digerido com *MfeI* e as digestões corridas num gel de agarose a 0,8%. O ADN foi transferido para uma membrana Nytran SuPerCharge utilizando o kit Turbo Blotter (Schleicher & Schuell, Keene, NH). A sonda foi gerada por amplificação por PCR da sequência codificante do gene *pilA* de 86-028NP, utilizando os iniciadores 5'tgtgacacttccgcaaaaa (SEQ ID N° 23) e 5'taataaaaggaaaatgaatga (SEQ ID N° 24). O produto de amplificação foi purificado utilizando um kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen Inc., Valencia, CA). Seguindo as direcções do fabricante, 100 ng de produto de PCR purificado foram marcados com peroxidase de rábano utilizando o *ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System* (Amersham Biosciences UK Ltd., Little Chalfont, Bucks, UK). As transferências desenvolvidas foram expostas a filme de raios X *Fuji Super Rx* (Fuji Photo Film Co., Tóquio, Japão).

O polipéptido *PilA* da estirpe 86-028NP de NTHi tem uma massa molecular prevista e aparente de, aproximadamente, 14 kDa, contém uma fenilalanina N-terminal metilada.

Exemplo 2

A estirpe 86-028NP de NTHi formou agregados clássicos num ensaio de translocação de subsuperfície de agar e um ensaio de crescimento de superfície, quando cultivada sob condições de depleção de nutriente.

A estirpe 86-028NP de NTHi foi cultivada em agar de chocolate, durante 18-20 horas (37 °C, CO₂ a 5%, numa atmosfera humidificada), antes de todas as experiências. Subsequentemente, este organismo foi inoculado, sobre sBHI, um meio rico sobre o qual a NTHi cresce muito bem, ou um meio quimicamente definido que suporta o crescimento de *H. influenzae* (Coleman *et al.* *J. Clin. Micro.*, 41: 4408-4410, 2003) que era compreendido por meios RPMI 1640 a 83% (Gibco BRL, Rockville, MD), piruvato de sódio (87,3 mM) (Gibco BRL), β -NAD (0,0087 mg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), HEME-histidina (0,0175 mg/mL) (Sigma), Uracilo (0,087 mg/mL) (Sigma) e inosina (1,75 mg/mL) (Sigma).

Ambos os agares foram vertidos para dentro de um de dois formatos, em lâminas de câmara de 8 poços estéreis (Lab-tech, Naperville, IL) ou para dentro de placas de Petri de vidro de 35 mm estéreis (Fisher Scientific, localização). Quando a lâmina de vidro foi separada das lâminas de câmara de 8 poços, o agar permaneceu dentro das câmaras possibilitando, deste modo, a utilização da superfície do "fundo" do agar para inoculação que é ótima para o ensaio de mobilidade de contracção e distensão, em virtude da relativa lisura desta superfície (Semmler *et al.*, *Microbiology*, 145, 2863-2873, 1999 e Mattick, *Ann. Rev. Microbiol.*, 56, 289-314, 2002). Enquanto os agares fundidos em lâminas de câmara de 8 poços foram utilizados para demonstrar um

fenótipo de crescimento de superfície, os agares vertidos para dentro das placas de Petri foram utilizados para demonstração de translocação de agar de subsuperfície (Semmler *et al.*, *supra*), enquanto os agares fundidos em lâminas de câmara de 8 poços foram utilizados para demonstrar o fenótipo de crescimento de superfície de agar. Todos os ensaios foram repetidos um mínimo de três vezes, em dias separados.

Os agares que tinham sido vertidos para dentro de placas de Petri de vidro estéreis foram inoculados em subsuperfície com 0,5 µL de uma suspensão de NTHi, cultivados como anteriormente descrito, utilizando uma ponta de micropipeta estéril. As placas foram observadas após incubação de 24 horas (37 °C, CO₂ a 5%) e foram, depois, mantidas à temperatura ambiente (25 °C) durante mais 24 horas, antes de releitura para sinais de translocação bacteriana entre a superfície do fundo do agar e a placa de Petri de vidro.

Em meio SBHI, 24 horas pós-inoculação, foi observado que a NTHi tinha crescido numa pequena área (~0,5 mm de raio) rodeando o local de inoculação entre o agar e o fundo da placa de Petri de vidro. Após mais 24 horas, o padrão de crescimento permaneceu semelhante àquele observado às 24 horas. No meio quimicamente definido, após 24 horas de incubação, foi observado crescimento de NTHi entre a superfície de agar e o fundo da placa de Petri de vidro, a uma distância 2 a 5 mm do local de inoculação. As bactérias também se tinham agregado em pequenas colónias num padrão semelhante a halo rodeando o local de inoculação. Após 48 horas, a NTHi tinha formado uma matriz muito distinta de microcolónias, com muitas ocorrendo a uma distância > 5 mm do local de inoculação. A formação de microsatélites até uma distância de 5 mm do local original de inoculação foi uma

verificação distintiva de crescimento em meio quimicamente definido e nunca foi verificada quando a estirpe 86-028NP foi cultivada em agar rico.

As lâminas de câmara foram inoculadas com 0,5 µL de uma suspensão de NTHi cultivada em agar de chocolate 18-20 horas [suspensa em solução salina apirogênica estéril (American Pharmaceutical Partners Inc., Schaumburg, IL)] ou uma única colônia foi golpeada para transferência para a superfície do agar com um palito estéril.

Em meio SBHI, trinta minutos pós-inoculação, a NTHi surgiu em associação próxima com a superfície de agar e estava a crescer num padrão semelhante a folha. Às 2,5 horas, aproximadamente 80-90% da área de superfície estava coberta com uma fina folha de bactérias. Também nesta altura, começaram a surgir microagregados de NTHi. Às 6 - 7 horas pós-inoculação, estes microagregados eram discerníveis a olho nu e havia, aproximadamente, 3-5 microagregados por poço. Adicionalmente, as NTHi eram ainda observadas como estando a crescer como uma folha que cobria, aproximadamente, 50-70% da superfície de agar. Vinte e quatro horas após a inoculação, as NTHi surgiam como grandes colônias únicas em cada local de inoculação.

Em meio quimicamente definido, como aquele observado em SBHI, trinta minutos pós-inoculação, parecia que as NTHi estavam a crescer em folha, contudo a densidade das bactérias parecia muito menor do que aquela observada em agar SBHI. Às 2,5 horas após inoculação, numerosos microagregados eram evidentes por toda a superfície de agar. Em contraste com aqueles notados quando a NTHi foi inoculada sobre agar SBHI, estes microagregados eram maiores e muito mais densos em aparência.

Aproximadamente 30-40 microagregados poderiam ser observados em cada poço. Existia ainda uma grande área de crescimento, semelhante a folha, de NTHi neste intervalo de tempo, com aproximadamente 80% da área de superfície coberta por bactérias. Às 6-7 horas após inoculação, os microagregados eram maiores, mais densos e facilmente observados a olho nu. Também, áreas de crescimento radial ou halos eram observadas radiando para o exterior de grandes colónias, semelhantes aos padrões de crescimento descritos para as espécies *Neisseria* e *Pseudomonas* (refs). Neste período de tempo, a maioria das bactérias parecia estar organizada em pequenos aglomerados ou microagregados, com uma proporção muito pequena observada a cobrir a superfície de agar como uma folha ou monocamada. Após 24 horas, havia colónias únicas de grandes dimensões em cada local de inoculação, contudo, havia, também, muitas colónias satélite pequenas, presentes sobre toda a superfície de agar, incluindo locais remotos dos pontos de inoculação.

Deste modo, a estirpe 86-028NP de NTHi demonstra formação de agregado clássico, semelhante àquele referido para *P. aeruginosa* expressando *pilus* de tipo IV (Semmler et al., *Microbiology*, 145(10), 2863-2873, 1999), quando cultivada sob condições de depleção de nutriente.

Exemplo 3

O movimento de células NTHi individuais entre uma lamela de vidro e uma superfície lisa de agar foi seguido por microscopia vídeo. As células movimentaram-se a, aproximadamente, 0,42 $\mu\text{m/s}$, consistente com aquela referida para a contracção e distensão de *P. aeruginosa* (Skerker e Berg, *Proc. Natl. Acad., Sci. USA*, 98,

6901-6904, 2001) e *Neisseria gonorrhoeae* (Merz et al., Nature, 207, 98-102, 2000).

Uma ansada da estirpe 86-028NP de NTHi, cultivada em agar de chocolate, a 37 °C e CO₂ a 5%, durante 20 horas e, depois, mantida à temperatura ambiente durante mais 24 horas, foi suspensa em água estéril e 0,5 µL da suspensão resultante foram colocados sobre uma lâmina de vidro estéril. De modo a proporcionar contraste e, deste modo, auxiliar a visualização, foram adicionados 0,5 µL de azul de tripano (0,4%, Sigma, St. Louis MO) à suspensão bacteriana. A gotícula foi, depois, coberta com uma lamela estéril e vista por meio de microscópio óptico (Axioskope 40, Zeiss, Thornwood, NI). Os espécimes foram observados à temperatura ambiente, ao longo de um período de, aproximadamente, 15-20 minutos. As bactérias eram facilmente observáveis e foi notado movimento direccional de várias, embora nem todas, células ou microagregados de células. Para estimular a actividade, foram adicionados 0,5 µL de uma solução heme (1 mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO) a um lado da lamela estéril. A actividade de contracção e distensão foi documentada tanto pela captura de vídeo [sistema de otoscopia vídeo (MEDRx Inc, Seminole, FL) ligado a um VCR] como de imagens fixas, para determinar a duração e velocidade de excursões.

As células individuais, ou microagregados de células, percorreram uma distância linear total de, aproximadamente, 11,0 µm ao longo de um período de 51 segundos (velocidade de, aproximadamente, 0,22 µm/s). Contudo, ao longo de todo o período de observação, a velocidade da mobilidade de contracção e distensão observada variou entre 0,14 e 0,48 µm/s.

Exemplo 4

Os *pili* de tipo IV foram visualizados por coloração negativa e microscopia electrónica de transmissão.

Culturas de um dia para o outro da estirpe 86-028NP de NTHi foram inoculadas sobre placas de sBHI e agar definido e incubadas durante 2, 6 ou 24 horas, a 37 °C, CO₂ a 5%. Adicionalmente, as culturas foram inoculadas dentro de caldo sBHI e caldo definido e incubadas, durante 2,5 ou 5,5 horas. Estes últimos intervalos de tempo representam a entrada nas fases exponencial e *lag* do crescimento, respectivamente. As bactérias foram, depois, coradas negativamente utilizando uma solução filtrada com Whatman, contendo acetato de amónio a 2,0%, p/v, (Sigma) e molibdato de amónio a 2,0%, p/v, (Sigma) em água estéril (Bakaletz *et al.* *Infect Immun*, 1988 56: 331-5). Grelhas de cobre revestidas com *Formvar* e carbono, malha 300, (Electron Microscopy Sciences) foram tocadas em colónias individuais cultivadas em placas de agar e, depois, flutuadas sobre uma gotícula da solução de coloração negativa. As culturas cultivadas em caldo foram sedimentadas, as bactérias ressuspensas em água estéril e as grelhas foram flutuadas sobre volumes iguais de suspensão bacteriana e coloração negativa. Após 5 minutos, as grelhas foram transferidas e deixadas a secar ao ar, antes de visualização num microscópio electrónico de transmissão Hitachi, Modelo H-600, provido de monitor vídeo (Gatan, Inc., Pleasanton, CA) e sistema de imagiologia digital (Gatan, Inc.).

Quando as NTHi foram cultivadas em sBHI, não foram observadas estruturas semelhantes a *pilus* de tipo IV. De modo contrário, quando cultivadas sob condições de nutriente

definido, verificou-se que as NTHi expressavam estruturas de, aproximadamente, 6 - 7 nm de diâmetro. Verificou-se que muitas destas estruturas se encontravam, também, livres na superfície da grelha. Havia, aproximadamente, 5 a 6 *pili* por célula bacteriana e estes eram polares em localização.

Exemplo 5

Foi gerado um mutante, deficiente na expressão de PilA, de modo a caracterizar adicionalmente componentes das estruturas, observados quando a estirpe 86-028NP foi cultivada em condições alcalinas em meios quimicamente definidos.

O gene *pilA* e, aproximadamente, 1 kb 5' e 3' do gene da estirpe 86-028NP foram amplificados por PCR, clonados em pGEM-T Easy (Promega) e a sequência de ADN determinada, de modo a verificar que, como resultado da amplificação por PCR, não existiam alterações na sequência no clone. Visto que não existia qualquer sítio de restrição conveniente no gene *pilA*, foi manipulado um sítio *Bam*HI dentro do gene utilizando o kit *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* da Stratagene. A construção resultante foi linearizada com *Bam*HI e o gene foi inativado por inserção com a cassette Ω Kn-2 (Perez-Casal *et al.*, *J. Bacteriol.*, 173: 2617-2624, 1991). A construção resultante foi linearizada e transformada na estirpe 86-028NP utilizando o método MIV (Poje e Redfield, p. 57-70 *in* Herbert *et al.* (Eds.), *Haemophilus influenzae Protocols*, Human Press Inc., Toronto, 2003). Os clones resistentes a canamicina foram seleccionados e a inactivação insercional do gene *pilA* de 86-028NP foi verificada em clones seleccionados por hibridação de Southern.

Quando o mutante *pilA* foi avaliado para expressão de *pili* de tipo IV, após crescimento sob condições que induziram a expressão aumentada de *pili* de tipo IV no isolado parental (Exemplo 4), não foram observados *pili* de tipo IV, associados a células ou livres, confirmando que o produto génico *pilA* (e/ou os produtos génicos *pilBCD*, visto que é provável que a mutação *pilA* dissocie os produtos génicos a jusante) é requerido para a expressão de *pilus*.

Exemplo 6

De modo a determinar se os *pili* de tipo IV são necessários para colonização da nasofaringe, assim como sobrevivência e/ou capacidade para formar um biofilme no ouvido médio, foram provocadas catorze chinchilas adultas, intranasalmente e transbularmente, com a estirpe parental 86-028NP ou com um mutante isogénico de *pilA* (Exemplo 5). Nos dias 2, 5, 10, 15 e 20 pós-provocação, foram realizadas lavagens nasofaríngeas e punções epitimpânicas e foram recuperadas mucosas nasais e de ouvido médio de 1-2 chinchilas por coorte, de modo a determinar cfu de NTHi em cada um destes locais anatómicos. Tanto o parental como o mutante de *pilA* foram capazes de sobreviver no hospedeiro chinchila durante vinte dias. Contudo, enquanto ambas as estirpes estavam presentes em quantidades equivalentes em fluidos de lavagem e punção, quando ensaiadas para uma subpopulação aderente em homogeneizados tecidulares de mucosas nasais, o mutante de *pilA* estava ausente ou abaixo da capacidade de detecção, em 80% dos homogeneizados recuperados após o dia 5, enquanto 87% de mucosas nasais semelhantes recuperadas de animais provocados com o isolado parental eram positivas para cultura.

Foi realizada microscopia confocal em tecido congelado instantaneamente, de modo a determinar se um biofilme estava presente. A biomassa formada pelo mutante de *pilA* no ouvido médio era de um carácter diferente da do biofilme bem estruturado característico do isolado parental. Os dados indicam que os *pili* de tipo IV de NTHi desempenham um papel chave no decorrer da doença de OM.

Exemplo 7

O gene *pilA* de dez isolados clínicos de NTHi foi sequenciado. As sequências nucleotídicas e de aminoácidos dos isolados são, respectivamente, apresentadas como se segue: 1728MEE em SEQ ID N°: 25 e 26, 1729MEE em SEQ ID N°: 27 e 28, 3224A em SEQ ID N°: 29 e 30, 10548MEE em SEQ ID N°: 31 e 32, 1060MEE em SEQ ID N°: 33 e 34, 1885MEE em SEQ ID N°: 35 e 36, 1714MEE em SEQ ID N°: 37 e 38, 1236MEE em SEQ ID N°: 39 e 40, 1128MEE em SEQ ID N°: 41 e 42 e 214NP em SEQ ID N°: 43 e 44. Um alinhamento das sequências de aminoácidos com aquelas dos polipéptidos *pilA* de Rd e 86-028NP é apresentado na Figura 1.

Os genes *pilA* de todos os isolados codificam um péptido condutor de 12 resíduos que é largamente invariante, excepto uma substituição de Q para L na posição 6 em dois isolados, assim como na estirpe Rd. O PilA maduro contém 137 resíduos e está previsto conter uma fenilalanina metilada característica na posição +1. Os resíduos de tirosina nas posições +24 e +27, e que se pensa estarem envolvidos em interacções subunidade-subunidade, são altamente conservados, como o são quatro resíduos Cys nas posições +50, +60, +119 e

+132. Interessantemente, as proteínas Pila de NTHi parecem representar uma nova classe de *pili* de tipo IV. O péptido condutor é maior do que aquele característico para as pilinas de tipo IVa (de um modo típico, 5-6 resíduos em comprimento), contudo mais pequenos do que o péptido condutor IVb típico (15-30 resíduos). Com 137 resíduos, a pilina de NTHi madura é mais curta do que as pilinas de classe IVa ou IVb (150 e 190 resíduos, respectivamente). Visto que as proteínas Pila de NTHi começam com uma fenilalanina N-metilada, são mais como as pilinas de classe IVa, contudo em microfotografias electrónicas, *pili* de tipo IV de NTHi livres surgem sempre em feixes lateralmente associados, um fenótipo mais classicamente associado a pilinas de classe IVb, em virtude da sua capacidade para se auto-associarem através de interacções antiparalelas.

Em termos de diversidade da SEQuência de Pila de NTHi, globalmente estas sequências são altamente homólogas. Ver a Figura 1. Nas posições 55-64 e 79-87 existem duas áreas de diversidade potencialmente importante, se acessíveis à superfície e também visadas para o desenvolvimento de vacinas, em virtude de imunodominância protectora ou função de ligação de adesina. Dentro da primeira região, de entre os isolados clínicos, parecem existir dois variantes principais, um representando a maioria (sete de onze isolados, 64%) e caracterizado pela seguinte sequência: NET/ITNCT/MGGK e o outro representando a minoria (quatro de onze isolados, 36%) e caracterizado pela sequência: GKP/LST/SCSGGS. Existem, contudo, algumas variações menores adicionais nas posições +57 e +61 no agrupamento de maioria e nas posições +57 e +59 para o agrupamento de minoria. A diversidade notada na posição +61 é apenas verificada num isolado até à data (estirpe N° 1885), em que existe uma substituição de T para M. Dentro da segunda

região focada de diversidade (posição 79-87), parecem existir dois variantes também distribuídos de entre os isolados clínicos de NTHi. A sequência ASVKTQSGG está presente em cinco de onze isolados clínicos (~45%), enquanto a sequência KSVTTSNGA está presente em seis de onze isolados clínicos (~55%).

Globalmente, dos sete isolados com a sequência de maioria na posição 55-64, cinco isolados têm também o motivo KSVTTSNGA na região 79-87, com os restantes dois isolados tendo o motivo ASVKTQSGG nesta região. Dos quatro isolados clínicos restantes com a sequência de minoria na posição 55-64, três destes têm, também, o motivo ASVKTQSGG na região 79-87, com apenas um isolado tendo a sequência KSVTTSNGA neste domínio. Desse modo, dependendo se estas são ou não substituições conservativas e se as sequências residem dentro de áreas hidrófilas, acessíveis da superfície, de elevado índice antigénico e são, deste modo, alvos para o desenvolvimento de vacinas, pode ou não ser necessário incluir as mesmas como componentes baseados em *pili* de tipo IV para indução de uma resposta imunitária contra NTHi.

Exemplo 8

De modo a examinar o papel de *pili* de tipo IV na OM induzida por NTHi e determinar se os anticorpos de crianças durante doença natural reconhecem *pili* de tipo IV, foram sintetizados quatro péptidos sintéticos sequenciais, representando os aminoácidos 21-137 da SEQ ID N° 2 de Pila maduro da estirpe 86-028NP de NTHi e ensaiados por meio de biossensor *versus* um painel de soros pediátricos e efusões de ouvido médio obtidos de crianças com OM. O soro de crianças de 2, 6-7 ou 18-19 meses e 4-6 anos de idade com OM, causada por NTHi, foi segregado em grupos de baixa e elevada incidência, como determinado pelo número de episódios de OM.

Até à data, os anticorpos em soros obtidos de crianças de 2 e 6-7 meses de idade, quer de incidência elevada ou baixa de OM, demonstraram reactividade limitada com qualquer dos péptidos de *pili* de tipo IV, com valores de 3-38 e 4-61 unidades de ressonância (RU), respectivamente. Contudo, verificou-se uma diferença notável entre estes grupos com soro obtido aos 18-19 meses de idade. Enquanto os valores obtidos com soros do grupo de 18-19 meses de baixa incidência foram de 44-105 RU, os soros do painel de elevada incidência reconheceram os péptidos de *pili* de tipo IV até cinco vezes superior (81-528 RU). Aos 4-6 anos de idade, uma vez que as crianças resolvem naturalmente a OM, a reactividade contra os péptidos de *pili* de tipo IV entre os dois grupos de incidência era de novo semelhante. De modo a confirmar que a reactividade aqui observada era específica para doença causada por NTHi, os soros de crianças com OM causada por *S. pneumoniae* foram também ensaiados. Em qualquer caso, foram obtidos valores RU de 16-120 *versus* todos os péptidos de *pili* de tipo IV. De modo a

ensaiar para a presença de anticorpos dirigidos contra *pili* de tipo IV em efusões obtidas de ouvidos médios, estes fluidos foram também ensaiados por meio de biossensor. Enquanto as efusões de crianças com OM causada por *Streptococcus* eram não reactivas, aquelas recuperadas de crianças com OM causada por NTHi eram altamente reactivas com péptidos de *pili* de tipo IV. Colectivamente, os dados sugerem fortemente que os *pili* de tipo IV de NTHi são expressos *in vivo*, durante o decorrer da doença de OM e que estas estruturas são imunogénicas.

Exemplo 9

A identificação de imunogénios que conferem respostas imunitárias de protecção cruzada alargada contra NTHi pode ser efectuada como se segue.

Síntese de péptidos de pilina de NTHi

Para mapear tanto os domínios imunodominantes como de ligação de adesina de PilA, é sintetizado um painel de péptidos sequenciais de sobreposição, assim como péptidos derivados de duas áreas focadas de diversidade conhecida (ver o Exemplo 6 anterior). Por exemplo, irão ser sintetizados treze péptidos 15-mero com uma sobreposição de 5 resíduos, de modo a mapear a proteína de pilina madura integral de 137 resíduos. O péptido C-terminal final irá, na realidade, ser um 17-mero abrangendo os resíduos 121-137, para incorporar os dois aminoácidos finais de PilA maduro. De modo a acomodar as duas regiões descritas de diversidade, irão ser sintetizados dois variantes do péptido que abrange os resíduos 51-65 e dois variantes do péptido que

abrange os resíduos 79-95. Para acomodar totalmente esta última região de diversidade, são preparados dois péptidos variando em comprimento num aminoácido na extremidade N, visto que a região de diversidade abrange, na realidade, os resíduos 79-87. Em virtude do resíduo adicional, cada destes dois últimos péptidos irá ter 16-mers em comprimento. Deste modo, irá ser sintetizado um total de quinze péptidos: doze irão ser 15-meros, um irá ser um 17-mero e dois irão ser péptidos de 16-mero. Os péptidos são expostos na Tabela 2 abaixo, em que os números dos resíduos de aminoácidos correspondem aos aminoácidos em SEQ ID N° 2.

Tabela 2

Péptido	Sequência
OLP1 [Resíduos 1 - 15]	FTLIELMIVIAIIAI
OLP2 [Resíduos 11 - 25]	AIITAILATIAIPSYQ
OLP3 [Resíduos 21 - 35]	IPSYQNYTKKAAVSE
OLP4 [Resíduos 31 - 45]	AAVSELLQASAPYKA
OLP5 [Resíduos 41 - 55]	APYKADVELCVYSTN
OLP6vA [Resíduos 51 - 65]	VYSTNETTNTCTGGKN
OLP6vB [Resíduos 51 - 65]	VYSTGKPPSTCSGGSN
OLP7 [Resíduos 61 - 75]	TGGKNGIAADITTAK
OLP8 [Resíduos 71 - 85]	ITTAKGYVKSVTTSN
OLP9vA [Resíduos 79 -94] 77- 95	YVKSVTTSNGAITVKGDGT
OLP9vB [Resíduos 79 -94] 77- 95	YVASVKTTQSGGITVKGNGT
OLP10 [Resíduos 91 - 105]	KGDGTLANMEYILQA
OLP11 [Resíduos 101 - 115]	YLQATGNAATGVTW
OLP12 [Resíduos 111-125]	TGVTWTTTCKGTDAS
OLP13 [Resíduos 121-137]	GTDASLFPPANFCGSVTQ

Produção de pilina de NTHi recombinante (rPilA)

A proteína PilA recombinante (rPilA) pode ser produzida para servir como um produto mais facilmente renovável para utilização em ensaios, de modo a representar a proteína de subunidade de pilina integral. Para o efeito, é utilizado o protocolo publicado de Keizer *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 276: 24186-14193, 2001), que estudou uma pilina que tinha também quatro resíduos Cys, visto que irá ser crítico que a rPilA seja, de um modo semelhante, correctamente enrolada, de modo a possuir qualidades funcionais da subunidade de pilina nativa. Resumidamente, é manipulada uma pilina truncada, em que os primeiros 28 resíduos são removidos da extremidade N, de modo a prevenir a agregação, e esta pilina truncada irá ser adicionalmente manipulada para ser transportada para o periplasma por meio da incorporação de uma sequência condutora OmpA na construção. Utilizando esta estratégia, Keizer *et al.* geraram uma proteína pilina monomérica solúvel recombinante de *P. aeruginosa* que era capaz de se ligar ao seu receptor (asialo GM1) em ensaios *in vitro* e diminuir a morbidade e mortalidade em murganhos, quando o péptido era distribuído 15 min. antes de provocação heteróloga. Esta forma truncada solúvel, monomérica, de PilA de NTHi irá ser útil nos estudos descritos abaixo.

Mapeamento de domínios imunodominantes de PilA

Os péptidos e proteínas PilA nativos e recombinantes são utilizados em concertação com chinchila aguda e convalescente e soros pediátricos, além de fluidos de ouvido médio de chinchilas e crianças experienciando quer OM experimental ou natural causada por NTHi (todos disponíveis dentro da presente colecção de espécimes ou planeados para recolha como parte de uma iniciativa separada), de modo a mapear domínios imunodominantes de rPilA por meio de ELISA e, também, ensaios de biossensor. Resumidamente, os péptidos PilA, rPilA e *pili* nativos são ligados a placas de microtitulação de 96 poços ou a uma superfície de chip biossensor, depois, ensaiados para a quantidade relativa de anticorpo dentro de amostras de soro ou fluido de ouvido médio que se ligam a cada péptido.

Estes estudos identificam aquelas regiões da subunidade de pilina que são relativamente mais imunodominantes do que outras, como reconhecido pelo hospedeiro chinchila e criança humana. Em virtude do facto de o péptido sintético mais N-terminal ser constituído por aminoácidos altamente não polares (hidrófobos) e estarem, deste modo, provavelmente ocultos dentro da fibra de *pilus* e inacessíveis ao anticorpo, antecipa-se que este péptido 15-mer serve como um controlo *negativo* interno para os ensaios aqui descritos. Os soros pediátricos normais e os soros de chinchila naive irão servir como controlos séricos negativos e os fluidos de lavagem de ouvido médio recuperados de um animal naive irão ser utilizados como um controlo negativo para efusões recuperadas durante infecção por NTHi do ouvido médio.

Mapeamento de domínios de ligação de adesina de rPilA

Para mapear os domínios de ligação celular eucarióticos de PilA, são conduzidos ensaios de ELISA competitivo, assim como avaliações da capacidade dos péptidos de pilina sintéticos inibirem a ligação de NTHi a células eucarióticas em cultura celular, por meio de microscopia confocal. Para os ensaios de rastreio iniciais, as células alvo eucarióticas relevantes são cultivadas dentro de placas de microtitulação de 96 poços. As células irão ser lavadas, depois, pré-incubadas com péptidos de pilina sintéticos, rPilA ou *pili* de NTHi nativo [0,2 µg em PBS], de modo a determinar a sua capacidade relativa para bloquearem a ligação da estirpe 86-028NP de NTHi (cultivada sob condições conhecidas como promotoras da expressão de pilina) a estas células eucarióticas. A aderência relativa de NTHi irá ser determinada utilizando anti-soros policlonais dirigidos contra uma preparação de OMP de NTHi completa homóloga e proteína A conjugada a HRP, com a cor desenvolvida com tetrametilbenzidina (TMB). Para estes ensaios, irão ser utilizadas células alvo epiteliais relevantes [*i. e.*, células epiteliais de ouvido médio de chinchila (CMEE), células brônquicas/traqueais humanas normais (NHuBr), linha celular epitelial alveolar de tipo II humana (A549s)], uma célula alvo epitelial clinicamente irrelevante contra a qual NTHi não adere (CHO), assim como células alvo *endoteliais* [células endoteliais da veia umbilical humana (HCTVEC)].

Para aqueles péptidos que mostram actividade inibitória (de um modo típico, a exclusão é a $\geq 15\%$ da inibição de aderência relativamente aos controlos), é determinada qualquer dependência de dose para a capacidade de bloqueio de aderência bacteriana observada. A interacção pode ser adicionalmente avaliada por

condução de ensaios de aderência-bloqueio utilizando um sistema Transwell, em que as células epiteliais do aparelho respiratório (CMEE e NHuBr) são cultivadas na interface ar-fluido. Estas células são incubadas primeiro com péptidos sintéticos de interesse (ou controlos apropriados, *i. e.*, P5 e P2 de OMP isolados como controlos positivos e negativos para proteínas de superfície de NTHi envolvidas ou não em aderência, respectivamente e rPilA) de modo a tentar bloquear receptores de Tfp disponíveis, depois, irão ser lavadas 5X com meio de crescimento novo seguido de inoculação com $\sim 2-5 \times 10^7$ NTHi cultivadas sob condições que se sabe que irão promover a expressão de Tfp. As culturas irão ser lavadas de modo a remover bactérias não aderentes, depois fixas com metanol sobre gelo, durante 5 min, secas ao ar, enxaguadas com PBS e as membranas removidas do *Transwell* e colocadas sobre lamelas de vidro para imagiologia por meio de microscopia confocal. De modo a detectar NTHi aderente, soro de OMP anti-NTHi hiperimune de chinchila e FITC-proteína A, irão ser utilizados para documentar a interacção de NTHi com a sua célula alvo epitelial ou, inversamente, o bloqueio da sua interacção por péptidos que representam putativos domínios de ligação de adesina de PilA.

Escolha de imunogénio

Com base nos dados adquiridos anteriormente, os péptidos imunogénicos são escolhidos com base na imunodominância relativa, assim como na capacidade para inibir a aderência de NTHi a células alvo epiteliais respiratórias. Dependendo das características bioquímicas e estruturais das regiões de interesse, os péptidos irão ser produzidos como péptido(s) sintético(s) ou péptido(s) recombinante(s).

A imunogenicidade e eficácia protectora dos imunogénios de PilA são avaliadas inicialmente no modelo animal de chinchila aqui divulgado e em ensaios humanos.

Sumário de Exemplo

A evidência anterior indica que NTHi expressa *pili* de tipo IV funcional na sua superfície. As proteínas codificadas por estes genes são conhecidas como sendo importantes para competência de transformação em *H. influenzae* tipável e estão aqui contempladas como sendo também importantes para formação de biofilme por NTHi. Colectivamente, estas observações indicam que é provável que NTHi regule positivamente a expressão de *pili* de tipo IV no ambiente de restrição de nutriente do hospedeiro humano. Deste modo, *pili* de tipo IV representa um excelente alvo para uma vacina e/ou para uma estratégia antimicrobiana para estados patogénicos causados por NTHi, assim como as estirpes a, b, c, e, e f de *H. influenzae*.

LISTAGEM DA SEQUÊNCIAS

<110> Bakaletz, et al.

<120> PILI DE TIPO IV DE HAEMOPHILUS INFLUENZAE

<130> 28335/40731

<140> A ser atribuído

<141> 2004-12-21

<150> US 60/532296

<151> 2003-12-23

<160> 44

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 4345

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (403)..(852)

<400> 1

```
gcgatcatta aaattgacat attgcgtaat tcgcccattt cgttcgatca aacaatgtgc      60
tgaaacacgc atttgataaa tttctgcaaa ataaggatga atcttaggat ctaattttcc      120
ttgaaaaaaaa tcatccacat atccgcgcgc aaattgttct ggcggcagac taatataatg      180
aataaccaat aaggaaatat cctgtggatt tgggcgttta tcgaagtgag gtgactgaat      240
ttgccgacaa tccaatatac cttgttcaat atcttttagt ttttgcatac ttttttcctt      300
tttttgcgat caggatcgca gaaaaagtgc ggtcaatttt acaaacaat ttttcctttt      360
cacaatgtcg tcgctaacaa aggcctaata aaaggaaaat ga atg aaa cta aca      414
                                   Met Lys Leu Thr
                                   1
aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata gag cta atg att      462
Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile
5                               10                               15                               20
gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca att ccc tct tat      510
Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr
25                               30                               35
caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta ctg caa gcg tca      558
Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser
40                               45                               50
```

gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat agc aca aat gaa Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu 55 60 65	606
aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca gca gat ata acc Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr 70 75 80	654
aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc aac ggt gca ata Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile 85 90 95 100	702
aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa tat att ttg caa Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln 105 110 115	750
gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca aca act tgc aaa Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys 120 125 130	798
gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc gga agt gtc aca Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr 135 140 145	846
caa tga cgagctatgc tttacttcac actcagcgtg taaccgctca aaatggcgag Gln	902
atctttacga tctcgccaga tttatgggaa cgcaatcagc agcaacaatc cttgctcttg	962
cggtatcttg ctttgccact taaagaagaa aataatcgtc tttggctagg gggtgattct	1022
ctctccaatc tttcagcttg tgaaaccatt gcgtttataa caggaaaaacc tgtcgaacca	1082
atcttggttag aaagcagcca actcaaagaa ctgttacaac aacttactcc gcaccaaagt	1142
caagtggaag agcaagttaa attctatcaa catcaagaaa cccatcttga acaagaagat	1202
gatgaacctg ttatccgctt acttaatcag atcttttgaat ctgccttaca aaaaaatgcc	1262
tctgatattc atttagaaac cttggctgat cagtttcaag tgcggttttag aattgatggt	1322
gttttacaac cacaaccctt aataagcaaa atattcgcca atcgtattat ttcacgctta	1382
aaattactgg cttaaattaga tattagtga aatcgacttc cacaagatgg acgatttcaa	1442
tttaaaacca ctttttccga tattcttgat tttcgctttt caaccttacc aaccttggg	1502
ggcgaaaaaa tcgtgttgcg agcgcaacaa aataaacctg tagaacttag ctttgctgaa	1562
ctgggtatga ccgaaaaatca gcaacaagca tttcaacgct cacttagcca gccacaagga	1622
ttaatttttag taaccggccc cacaggaagt gggaaaagta tctcgcttta caccgcactt	1682
cagtggctaa atacgcctga taaacatatt atgaccgctg aagatcccat tgaaattgaa	1742
cttgatggta ttattcaaag ccaaattaat ccgcagattg gattagattt tagccgtcta	1802
ttgcgtgett ttttacgtca agatcccgac atcattatgc taggtgaaat tcgagatgaa	1862
gaaagtgcaa ggattgcact acgtgccgct caaacgggac atttggtgct ttcaacttta	1922

cataccaatg atgcaatata tgccattttct cgcttacaac aactcggtat tcaacaacat	1982
gaaattgaaa acagtttact actcgtcatt gcacagcgtc ttgtacgaaa aatctgtcca	2042
aagtgcggtg gaaatttaata aaattcttgt gattgccatc aaggttatcg agggcgaatc	2102
ggcgtgtatc aatttctaca ttggcaacag aatggctatc aaacggattt tgagaattta	2162
cgagagagtg gtttggaata agttagccaa ggcataacag atgagaaaga aattgaacgt	2222
gtgttaggta aaaactcatg actaaaaaac tcttttatta tcaaggtagt aacgcattaa	2282
atcagaaaca aaaaggctca attattgcgg atacgaaaca acaagcgcac tttcagttaa	2342
taagccgcgg gcttactcac atcaaattac aacaaaactg gcaatttggg gcaaaaccca	2402
aaaattcaga aatcagtga ttaactcaatc aattagcgac attgctacag tccgtaattc	2462
cgtaaaaaaa cagcctacaa attttgcaac aaaattgtac tcaaattatg ctcaacaaat	2522
ggcttgaacg actgcttcaa tccattgaat ctggcttagc attctcaca gccattgaac	2582
aacaaggaaa atatctcaca caacaagaaa ttcaactgat tcaagtggga gaaatgacag	2642
gaaaacttgc cgtagtttgt aaaaaaatag ccacgcaccg tagtcaatct ttggctttac	2702
aacgcaaatt acagaaaatt atgttatatc cctcaatggg attgggaatt tctctattat	2762
tgacactcgc attactgctt tttatcgcgc ctcaatttgc tgaaatgtac agtggcaata	2822
atgcggagtt accaacaata accgcaatat tgctctcaat atctaatttc cttaagcaaa	2882
atattggcat tttgctatct ttcgttttga gttttttct attttattat ttctatctaa	2942
aacgccagac ttggtttcat caaaagaaaa atcaacttat ttctatcacg cctatttttg	3002
gcacaattca aaagctttca cgtttagtga acttttagtca aagtttaca attatgttgc	3062
aggccggcgt accgcttaat caggcactag acagttttct tctctgcaca caaacttggc	3122
aaaccaagaa aacgcttgta aacgatatgg tattagataa agaagtgcgg tcaattttgc	3182
aatgggttct tcaaggetat gcgttttcta atagcgtaag tagcgatctt ttcccgatgg	3242
aagcacaaca aatgctacaa attggcgaaac aaagcggaaa actcgctttg atgctagagc	3302
atatcgcaga taattacca gaaaaactta atcatcaaat tgacttactc tcacaaatgc	3362
tagaaccatt aatgatggta atcatcggca gtctgattgg gattattatg atgggaatgt	3422
atttacctat ctttaatatg ggatcagtta ttcaatgatt taactcaca tgtttttatt	3482
aggcggcact ttagggatcg cattgtgggt ctacctatct ggttttatta cgcatttgca	3542
gcaagagatt tatgcgactt acgttgaatt atttccaca aacagttctc catttcaacc	3602
gcactttgcc tctattcaac aaaaaaagtg cggatcatatt ttgaggtatt tttttagtat	3662
tggggttggg tttatatctt tacaatttgc cttcaaagat tctatcttta ctgtatggat	3722
cggactcaca cttattatct tttggacaat cagttatctt gattggcact atcaacttat	3782

```

ttctacgaca ccctgtttat gggtacttac tctcggttta tttggcgag acaataactt 3842
ttcattgcta acgttatctg aaagcataaa aagtgggct agttttttta ttgttttcta 3902
cgcaatctat tggattgcaa aatgttatta tagaaaagaa gcctttggac ggggagatta 3962
ttggctagca atggcattag gaagttttat tcatttagaa accttaccgc actttttatt 4022
attagcctca gtgcttgga tatgtttttc gcttattcat aaaaagaaaa aagaatttat 4082
accttttgcc ccttttatga acttatcggc tatcattatt tatctcgtca aatattacgg 4142
atattaaaaa ggggaaaaca taatatTTTT ccctgttct tcatagaagt gcggttggtt 4202
ttacgaacgt ttcatactt caaaaaactc ttcggttggt ttcccatca tcagcttacc 4262
aatcaagaat tccattgcat ccacttcac cattggatta agaattctac gaagaatcca 4322
cattttttgt aattcgtccg ctg 4345

```

<210> 2

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 2

```

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

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
          20          25          30

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

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
          50          55          60

Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65          70          75          80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
          85          90          95

```

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 3

<211> 4345

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (849) .. (2243)

<400> 3

```

gcgatcatta aaattgacat attgcgtaat tcgcccatTT cgttcgatca aacaatgtgc      60
tgaaacacgc atttgataaa tttctgcaaa ataaggatga atcttaggat ctaattttcc      120
ttgaaaaaaaa tcatccacat atccgcgcgc aaattgttct ggcggcagac taatataatg      180
aataaccaat aaggaaatat cctgtggatt tgggcgttta tcgaagtga gtgactgaat      240
ttgccgacaa tccaatatac cttgttcaat atcttttagt ttttgcatac ttttttccct      300
tttttgcgat caggatcgca gaaaaagtgc ggtcaatttt acaacaaat ttttcctttt      360
cacaatgtcg tcgctaacaa aggcttaata aaaggaaaat gaatgaaact aacaacacag      420
caaaccttga aaaaaggggt tacattaata gagctaata ttgtgattgc aattattgct      480
attttagcca ctatcgcaat tccctcttat caaaattata ctaaaaaagc agcggtatct      540
gaattactgc aagcgtcagc gccttataag gctgatgtgg aattatgtgt atatagcaca      600

```

aatgaaacaa caaactgtac ggggtggaaaa aatgggtattg cagcagatat aaccacagca	660
aaaggctatg taaaatcagt gacaacaagc aacgggtgcaa taacagtaaa aggggatggc	720
acattggcaa atatggaata ttttttgcaa gctacaggta atgctgcaac aggtgtaact	780
tggacaacaa cttgcaaagg aacgggatgcc tctttatttc cagcaaattt ttgcggaagt	840
gtcacaca atg acg agc tat gct tta ctt cat act cag cgt gta acc gct	890
Met Thr Ser Tyr Ala Leu Leu His Thr Gln Arg Val Thr Ala	
1 5 10	
caa aat ggc gag atc ttt acg atc tcg cca gat tta tgg gaa cgc aat	938
Gln Asn Gly Glu Ile Phe Thr Ile Ser Pro Asp Leu Trp Glu Arg Asn	
15 20 25 30	
cag cag caa caa tcc ttg ctc ttg cgg tat ttt gct ttg cca ctt aaa	986
Gln Gln Gln Gln Ser Leu Leu Leu Arg Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Lys	
35 40 45	
gaa gaa aat aat cgt ctt tgg cta ggg gtt gat tct ctc tcc aat ctt	1034
Glu Glu Asn Asn Arg Leu Trp Leu Gly Val Asp Ser Leu Ser Asn Leu	
50 55 60	
tca gct tgt gaa acc att gcg ttt ata aca gga aaa cct gtc gaa cca	1082
Ser Ala Cys Glu Thr Ile Ala Phe Ile Thr Gly Lys Pro Val Glu Pro	
65 70 75	
att ttg tta gaa agc agc caa ctc aaa gaa ctg tta caa caa ctt act	1130
Ile Leu Leu Glu Ser Ser Gln Leu Lys Glu Leu Leu Gln Gln Leu Thr	
80 85 90	
ccg cac caa atg caa gtg gaa gag caa gtt aaa ttc tat caa cat caa	1178
Pro His Gln Met Gln Val Glu Glu Gln Val Lys Phe Tyr Gln His Gln	
95 100 105 110	
gaa acc cat ttt gaa caa gaa gat gat gaa cct gtt atc cgc tta ctt	1226
Glu Thr His Phe Glu Gln Glu Asp Asp Glu Pro Val Ile Arg Leu Leu	
115 120 125	
aat cag att ttt gaa tct gcc tta caa aaa aat gcc tct gat att cat	1274
Asn Gln Ile Phe Glu Ser Ala Leu Gln Lys Asn Ala Ser Asp Ile His	
130 135 140	
tta gaa acc ttg gct gat cag ttt caa gtg cgg ttt aga att gat ggt	1322
Leu Glu Thr Leu Ala Asp Gln Phe Gln Val Arg Phe Arg Ile Asp Gly	
145 150 155	
gtt tta caa cca caa ccc tta ata agc aaa ata ttc gcc aat cgt att	1370
Val Leu Gln Pro Gln Pro Leu Ile Ser Lys Ile Phe Ala Asn Arg Ile	
160 165 170	
att tca cgc tta aaa tta ctg gct aaa tta gat att agt gaa aat cga	1418
Ile Ser Arg Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Asp Ile Ser Glu Asn Arg	
175 180 185 190	
ctt cca caa gat gga cga ttt caa ttt aaa acc act ttt tcc gat att	1466
Leu Pro Gln Asp Gly Arg Phe Gln Phe Lys Thr Thr Phe Ser Asp Ile	
195 200 205	

ctt gat ttt cgc ctt tca acc tta cca acc cat tgg ggc gaa aaa atc	1514
Leu Asp Phe Arg Leu Ser Thr Leu Pro Thr His Trp Gly Glu Lys Ile	
210 215 220	
gtg ttg cga gcg caa caa aat aaa cct gta gaa ctt agc ttt gct gaa	1562
Val Leu Arg Ala Gln Gln Asn Lys Pro Val Glu Leu Ser Phe Ala Glu	
225 230 235	
ctg ggt atg acc gaa aat cag caa caa gca ttt caa cgc tca ctt agc	1610
Leu Gly Met Thr Glu Asn Gln Gln Ala Phe Gln Arg Ser Leu Ser	
240 245 250	
cag cca caa gga tta att tta gta acc ggc ccc aca gga agt ggg aaa	1658
Gln Pro Gln Gly Leu Ile Leu Val Thr Gly Pro Thr Gly Ser Gly Lys	
255 260 265 270	
agt atc tcg ctt tac acc gca ctt cag tgg cta aat acg cct gat aaa	1706
Ser Ile Ser Leu Tyr Thr Ala Leu Gln Trp Leu Asn Thr Pro Asp Lys	
275 280 285	
cat att atg acc gct gaa gat ccc att gaa att gaa ctt gat ggt att	1754
His Ile Met Thr Ala Glu Asp Pro Ile Glu Ile Glu Leu Asp Gly Ile	
290 295 300	
att caa agc caa att aat ccg cag att gga tta gat ttt agc cgt cta	1802
Ile Gln Ser Gln Ile Asn Pro Gln Ile Gly Leu Asp Phe Ser Arg Leu	
305 310 315	
ttg cgt gct ttt tta cgt caa gat ccc gac atc att atg cta ggt gaa	1850
Leu Arg Ala Phe Leu Arg Gln Asp Pro Asp Ile Ile Met Leu Gly Glu	
320 325 330	
att cga gat gaa gaa agt gca agg att gca cta cgt gcc gct caa acg	1898
Ile Arg Asp Glu Glu Ser Ala Arg Ile Ala Leu Arg Ala Ala Gln Thr	
335 340 345 350	
gga cat ttg gtg ctt tca act tta cat acc aat gat gca ata tct gcc	1946
Gly His Leu Val Leu Ser Thr Leu His Thr Asn Asp Ala Ile Ser Ala	
355 360 365	
att tct cgc tta caa caa ctc ggt att caa caa cat gaa att gaa aac	1994
Ile Ser Arg Leu Gln Gln Leu Gly Ile Gln Gln His Glu Ile Glu Asn	
370 375 380	
agt tta cta ctc gtc att gca cag cgt ctt gta cga aaa atc tgt cca	2042
Ser Leu Leu Leu Val Ile Ala Gln Arg Leu Val Arg Lys Ile Cys Pro	
385 390 395	
aag tgc ggt gga aat tta ata aat tct tgt gat tgc cat caa ggt tat	2090
Lys Cys Gly Gly Asn Leu Ile Asn Ser Cys Asp Cys His Gln Gly Tyr	
400 405 410	
cga ggg cga atc ggc gtg tat caa ttt cta cat tgg caa cag aat ggc	2138
Arg Gly Arg Ile Gly Val Tyr Gln Phe Leu His Trp Gln Gln Asn Gly	
415 420 425 430	
tat caa acg gat ttt gag aat tta cga gag agt ggt ttg gaa aaa gtt	2186
Tyr Gln Thr Asp Phe Glu Asn Leu Arg Glu Ser Gly Leu Glu Lys Val	
435 440 445	

agc caa ggc ata aca gat gag aaa gaa att gaa cgt gtg tta ggt aaa	2234
Ser Gln Gly Ile Thr Asp Glu Lys Glu Ile Glu Arg Val Leu Gly Lys	
450 455 460	
aac tca tga ctaaaaaact cttttattat caaggtagta acgcattaaa	2283
Asn Ser	
tcagaaacaa aaaggctcaa ttattgcgga tacgaaacaa caagcgcact ttcagttaat	2343
aagccgcggg cttactcaca tcaaattaca acaaaactgg caatttgggg caaaacccaa	2403
aaattcagaa atcagtgaat tactcaatca attagcgaca ttgctacagt ccgtaattcc	2463
gttaaaaaac agcctacaaa ttttgcaaca aaattgtact caaattatgc tcaacaaatg	2523
gcttgaacga ctgcttcaat ccattgaatc tggcttagca ttctcacaag ccattgaaca	2583
acaaggaaaa tatctcacac aacaagaaat tcaactgatt caagtgggag aaatgacagg	2643
aaaacttgcc gtagtttgta aaaaaatagc cacgcaccgt agtcaatctt tggttttaca	2703
acgcaaatta cagaaaatta tggtatatcc ctcaatggta ttgggaattt ctctattatt	2763
gacactcgca ttactgcttt ttatcgcgcc tcaatttgct gaaatgtaca gtggcaataa	2823
tgcgagagta ccaacaataa ccgcaatatt gctctcaata tctaatttcc ttaagcaaaa	2883
tattggcatt ttgctatttt tegtgttgag tttttttcta ttttattatt tctatctaaa	2943
acgccagact tggtttcac aaagaaaaa tcaacttatt tctatcacgc ctatttttgg	3003
cacaattcaa aagctttcac gtttagtgaa ctttagtcaa agtttacaaa ttatgttgca	3063
ggccggcgta ccgcttaatc aggcactaga cagttttctt cctcgcacac aaacttggca	3123
aaccaagaaa acgcttgtaa acgatatggg attagataaa gaagtgcggg caattttgca	3183
atgggtttct caaggctatg cgttttctaa tagcgtaagt agcgatcttt tcccgatgga	3243
agcacaacaa atgctacaaa ttggcgaaca aagcggaaaa ctcgctttga tgctagagca	3303
tatcgcagat aattaccaag aaaaacttaa tcatcaaatt gacttactct cacaaatgct	3363
agaaccatta atgatggtaa tcatcggcag tctgattggg attattatga tgggaatgta	3423
ttacctatc ttaaatatgg gatcagttat tcaatgattt acttcacaat gtttttatta	3483
ggcggcatct tagggatcgc attgtgggtt tacctatctg gttttattac gcattttgcag	3543
caagagattt atgcgactta cgttgaatta ttccacaaa acagttctcc atttcaaccg	3603
cactttgcct ctattcaaca aaaaaagtgc ggtcatattt tgaggatttt ttttagtatt	3663
ggggttggat ttatattttt acaaattgcc ttcaaagatt ctatttttac tgtatggatc	3723
ggactcacac ttattattct ttggacaatc agttatcttg attggcacta tcaacttatt	3783
tctacgacac cctgtttatg gttacttact ctcggtttat ttggcgagca caataacttt	3843
tcattgctaa cgttatctga aagcataaaa agtgcggtta gtttttttat tgttttctac	3903

gcaatctatt ggattgcaaa atgttattat agaaaagaag cctttggacg gggagattat 3963
tggctagcaa tggcattagg aagttttatt catttagaaa ccttaccgca ctttttatta 4023
ttagcctcag tgcttggaat atgtttttcg cttattcata aaaagaaaaa agaatttata 4083
ccttttgccc cttttatgaa cttatcggtt atcattatct atctcgtcaa atattacgga 4143
tattaataaag gggaaaacat aatatttttc ccttggttct catagaagtg cggttgtttt 4203
tacgaacggt tcatcacttc aaaaaactct tcgttggttt tcgccatcat cagcttatca 4263
atcaagaatt ccattgcac cacttcatcc attggattaa gaatcttacg aagaatccac 4323
attttttgta attcgtccgc tg 4345

<210> 4

<211> 464

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 4

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

Gln Met Gln Val Glu Glu Gln Val Lys Phe Tyr Gln His Gln Glu Thr
 100 105 110

His Phe Glu Gln Glu Asp Asp Glu Pro Val Ile Arg Leu Leu Asn Gln
 115 120 125

Ile Phe Glu Ser Ala Leu Gln Lys Asn Ala Ser Asp Ile His Leu Glu
 130 135 140

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

Gln Pro Gln Pro Leu Ile Ser Lys Ile Phe Ala Asn Arg Ile Ile Ser
 165 170 175

Arg Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Asp Ile Ser Glu Asn Arg Leu Pro
 180 185 190

Gln Asp Gly Arg Phe Gln Phe Lys Thr Thr Phe Ser Asp Ile Leu Asp
 195 200 205

Phe Arg Leu Ser Thr Leu Pro Thr His Trp Gly Glu Lys Ile Val Leu
 210 215 220

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

Met Thr Glu Asn Gln Gln Gln Ala Phe Gln Arg Ser Leu Ser Gln Pro
 245 250 255

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

Ser Leu Tyr Thr Ala Leu Gln Trp Leu Asn Thr Pro Asp Lys His Ile
 275 280 285

Met Thr Ala Glu Asp Pro Ile Glu Ile Glu Leu Asp Gly Ile Ile Gln
 290 295 300

Ser Gln Ile Asn Pro Gln Ile Gly Leu Asp Phe Ser Arg Leu Leu Arg
 305 310 315 320

Ala Phe Leu Arg Gln Asp Pro Asp Ile Ile Met Leu Gly Glu Ile Arg
 325 330 335

Asp Glu Glu Ser Ala Arg Ile Ala Leu Arg Ala Ala Gln Thr Gly His
 340 345 350

Leu Val Leu Ser Thr Leu His Thr Asn Asp Ala Ile Ser Ala Ile Ser
355 360 365

Arg Leu Gln Gln Leu Gly Ile Gln Gln His Glu Ile Glu Asn Ser Leu
370 375 380

Leu Leu Val Ile Ala Gln Arg Leu Val Arg Lys Ile Cys Pro Lys Cys
385 390 395 400

Gly Gly Asn Leu Ile Asn Ser Cys Asp Cys His Gln Gly Tyr Arg Gly
405 410 415

Arg Ile Gly Val Tyr Gln Phe Leu His Trp Gln Gln Asn Gly Tyr Gln
420 425 430

Thr Asp Phe Glu Asn Leu Arg Glu Ser Gly Leu Glu Lys Val Ser Gln
435 440 445

Gly Ile Thr Asp Glu Lys Glu Ile Glu Arg Val Leu Gly Lys Asn Ser
450 455 460

<210> 5

<211> 4345

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (2240)..(3460)

<400> 5

```
gcgatcatta aaattgacat attgcgtaat tcgcccattt cgttcgatca aacaatgtgc      60
tgaaacacgc atttgataaa tttctgcaaa ataaggatga atcttaggat ctaattttcc      120
ttgaaaaaaa tcatccacat atccgccgcc aaattgttct ggcggcagac taatataatg      180
aataaccaat aaggaaatat cctgtggatt tgggcgttta tcgaagtgag gtgactgaat      240
ttgccgacaa tccaatatac cttgttcaat atcttttagt ttttgcatat ttttttcctt      300
```

tttttgcgat caggatcgca gaaaaagtgc ggtcaatttt acaacaaat ttttcctttt	360
cacaatgtcg tcgctaacaa aggcctaata aaaggaaaat gaatgaaact aacaacacag	420
caaaccttga aaaaagggtt tacattaata gagctaata ttgtgattgc aattattgct	480
attttagcca ctatcgcaat tccctcttat caaaattata ctaaaaaage agcggatatct	540
gaattactgc aagcgtcagc gccttataag gctgatgtgg aattatgtgt atatagcaca	600
aatgaaacaa caaactgtac ggggtgaaaa aatggatttg cagcagatat aaccacagca	660
aaaggctatg taaatcagt gacaacaagc aacggtgcaa taacagtaaa aggggatggc	720
acattggcaa atatggaata tattttgcaa gctacagga atgctgcaac aggtgtaact	780
tggacaacaa cttgcaaagg aacggatgcc tctttatttc cagcaaattt ttgcggaagt	840
gtcacacaat gacgagctat gctttacttc atactcagcg tgtaaccgct caaatggcg	900
agatctttac gatctcgcca gatttatggg aacgcaatca gcagcaacaa tccttgctct	960
tgcggtattt tgctttgcca cttaaagaag aaaataatcg tctttggcta ggggttgatt	1020
ctctctccaa tctttcagct tgtgaaacca ttgcgtttat aacaggaaaa cctgtcgaac	1080
caattttgtt agaaagcagc caactcaaag aactgttaca acaacttact ccgcacccaaa	1140
tgcaagtgga agagcaagtt aaattctatc aacatcaaga aaccatttt gaacaagaag	1200
atgatgaacc tggtatccgc ttacttaatc agatttttga atctgcctta caaaaaaatg	1260
cctctgatat tcatttagaa accttggtg atcagtttca agtgcggttt agaattgatg	1320
gtgttttaca accacaaccc ttaataagca aaatatccgc caatcgtatt atttcacgct	1380
taaaattact ggctaaatta gatattagtg aaaatogact tccacaagat ggacgatttc	1440
aatttaaaac cactttttcc gatattcttg attttcgct ttcaacctta ccaaccatt	1500
ggggcgaaaa aatcgtgttg cgagcgcaac aaaataaacc tgtagaactt agctttgctg	1560
aactgggtat gaccgaaaat cagcaacaag catttcaacg ctcacttagc cagccacaag	1620
gattaatttt agtaaccggc cccacaggaa gtgggaaaag tatctcgctt tacaccgcac	1680
ttcagtggct aaatacgctt gataaacata ttatgaccgc tgaagatccc attgaaattg	1740
aacttgatgg tattattcaa agccaaatta atccgcagat tggattagat tttagccgct	1800
tattgcgtgc ttttttacgt caagatcccg acatcattat gctaggtgaa attcgagatg	1860
aagaaagtgc aaggattgca ctacgtgccg ctcaaacggg acatttggtg ctttcaactt	1920
tacataccaa tgatgcaata tctgccattt ctgcgttaca acaactcggg attcaacaac	1980
atgaaattga aaacagttta ctactcgtca ttgcacagcg tcttgtaaga aaaatctgtc	2040
caaagtgcgg tggaaattta ataaattctt gtgattgcca tcaaggttat cgagggcgaa	2100
tcggcgtgta tcaatttcta cattggcaac agaattggcta tcaaacggat tttgagaatt	2160

tacgagagag	tggtttggaa	aaagttagcc	aaggcataac	agatgagaaa	gaaattgaac	2220
gtgtgttagg	taaaaactc	atg act	aaa aaa	ctc ttt	tat tat	caa ggt agt
		Met Thr	Lys Lys	Leu Phe	Tyr Tyr	Gln Gly Ser
		1		5		10
aac gca tta	aat cag	aaa caa	aaa ggc	tca att	att gcg	gat acg aaa
Asn Ala Leu	Asn Gln	Lys Lys	Gly Ser	Ile Ile	Ala Asp	Thr Lys
	15		20		25	
caa caa gcg	cac ttt	cag tta	ata agc	cgc ggg	ctt act	cac atc aaa
Gln Gln Ala	His Phe	Gln Leu	Ile Ser	Arg Gly	Leu Thr	His Ile Lys
	30		35		40	
tta caa caa	aac tgg	caa ttt	ggg gca	aaa ccc	aaa aat	tca gaa atc
Leu Gln Gln	Asn Trp	Gln Phe	Gly Ala	Lys Pro	Lys Asn	Ser Glu Ile
	45		50		55	
agt gaa tta	ctc aat	caa tta	gcg aca	ttg cta	cag tcc	gta att ccg
Ser Glu Leu	Leu Asn	Gln Leu	Ala Thr	Leu Leu	Gln Ser	Val Ile Pro
60		65		70		75
tta aaa aac	agc cta	caa att	ttg caa	caa aat	tgt act	caa att atg
Leu Lys Asn	Ser Leu	Gln Ile	Leu Gln	Gln Asn	Cys Thr	Gln Ile Met
	80		85		90	
ctc aac aaa	tgg ctt	gaa cga	ctg ctt	caa tcc	att gaa	tct ggc tta
Leu Asn Lys	Trp Leu	Glu Arg	Leu Leu	Gln Ser	Ile Glu	Ser Gly Leu
	95		100		105	
gca ttc tca	caa gcc	att gaa	caa caa	gga aaa	tat ctc	aca caa caa
Ala Phe Ser	Gln Ala	Ile Glu	Gln Gln	Gly Lys	Tyr Leu	Thr Gln Gln
	110		115		120	
gaa att caa	ctg att	caa gtg	gga gaa	atg aca	gga aaa	ctt gcc gta
Glu Ile Gln	Leu Ile	Gln Val	Gly Glu	Met Thr	Gly Lys	Leu Ala Val
	125		130		135	
gtt tgt aaa	aaa ata	gcc acg	cac cgt	agt caa	tct ttg	gct tta caa
Val Cys Lys	Lys Ile	Ala Thr	His Arg	Ser Gln	Ser Leu	Ala Leu Gln
140		145		150		155
cgc aaa tta	cag aaa	att atg	tta tat	ccc tca	atg gta	ttg gga att
Arg Lys Leu	Gln Lys	Ile Met	Leu Tyr	Pro Ser	Met Val	Leu Gly Ile
	160		165		170	
tct cta tta	ttg aca	ctc gca	tta ctg	ctt ttt	atc gcg	cct caa ttt
Ser Leu Leu	Leu Thr	Leu Ala	Leu Leu	Leu Phe	Ile Ala	Pro Gln Phe
	175		180		185	
gct gaa atg	tac agt	ggc aat	aat gcg	gag tta	cca aca	ata acc gca
Ala Glu Met	Tyr Ser	Gly Asn	Asn Ala	Glu Leu	Pro Thr	Ile Thr Ala
	190		195		200	
ata ttg ctc	tca ata	tct aat	ttc ctt	aag caa	aat att	ggc att ttg
Ile Leu Leu	Ser Ile	Ser Asn	Phe Leu	Lys Gln	Asn Ile	Gly Ile Leu
	205		210		215	
cta ttt ttc	gtt ttg	agt ttt	ttt cta	ttt tat	tat ttc	tat cta aaa
Leu Phe Phe	Val Leu	Ser Phe	Phe Leu	Phe Tyr	Tyr Phe	Tyr Leu Lys
220		225		230		235

cgc cag act tgg ttt cat caa aag aaa aat caa ctt att tct atc acg Arg Gln Thr Trp Phe His Gln Lys Lys Asn Gln Leu Ile Ser Ile Thr 240 245 250	2992
cct att ttt ggc aca att caa aag ctt tca cgt tta gtg aac ttt agt Pro Ile Phe Gly Thr Ile Gln Lys Leu Ser Arg Leu Val Asn Phe Ser 255 260 265	3040
caa agt tta caa att atg ttg cag gcc ggc gta ccg ctt aat cag gca Gln Ser Leu Gln Ile Met Leu Gln Ala Gly Val Pro Leu Asn Gln Ala 270 275 280	3088
cta gac agt ttt ctt cct cgc aca caa act tgg caa acc aag aaa acg Leu Asp Ser Phe Leu Pro Arg Thr Gln Thr Trp Gln Thr Lys Lys Thr 285 290 295	3136
ctt gta aac gat atg gta tta gat aaa gaa gtg cgg tca att ttg caa Leu Val Asn Asp Met Val Leu Asp Lys Glu Val Arg Ser Ile Leu Gln 300 305 310 315	3184
tgg gtt tct caa ggc tat gcg ttt tct aat agc gta agt agc gat ctt Trp Val Ser Gln Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Ser Val Ser Ser Asp Leu 320 325 330	3232
ttc ccg atg gaa gca caa caa atg cta caa att ggc gaa caa agc gga Phe Pro Met Glu Ala Gln Gln Met Leu Gln Ile Gly Glu Gln Ser Gly 335 340 345	3280
aaa ctc gct ttg atg cta gag cat atc gca gat aat tac caa gaa aaa Lys Leu Ala Leu Met Leu Glu His Ile Ala Asp Asn Tyr Gln Glu Lys 350 355 360	3328
ctt aat cat caa att gac tta ctc tca caa atg cta gaa cca tta atg Leu Asn His Gln Ile Asp Leu Leu Ser Gln Met Leu Glu Pro Leu Met 365 370 375	3376
atg gta atc atc ggc agt ctg att ggg att att atg atg gga atg tat Met Val Ile Ile Gly Ser Leu Ile Gly Ile Ile Met Met Gly Met Tyr 380 385 390 395	3424
tta cct atc ttt aat atg gga tca gtt att caa tga tttacttcac Leu Pro Ile Phe Asn Met Gly Ser Val Ile Gln 400 405	3470
aatgttttta ttaggcggca tcttagggat cgcattgttg ttctacctat ctggttttat 3530	
tacgcatttg cagcaagaga tttatgcgac ttacgttgaa ttatttcac aaaacagttc 3590	
tccatttcaa ccgcactttg cctctattca acaaaaaaag tgcggtcata ttttgaggta 3650	
tttttttagt attgggggtg gatttatatt ttacaaatt gccttcaaag attctatttt 3710	
tactgtatgg atcggaactca cacttattat tctttggaca atcagttatc ttgattggca 3770	
ctatcaactt attttctacga caccctgttt atggttactt actctcggtt tatttggcgc 3830	
agacaataac ttttcattgc taacgttatc tgaaagcata aaaagtgcgg ctagtttttt 3890	
tattgttttc tacgcaatct attggattgc aaaatgttat tatagaaaag aagccttttg 3950	
acgggggagat tattggctag caatggcatt aggaagtttt attcatttag aaaccttacc 4010	

gcacttttta ttattagcct cagtgccttg aatatgtttt togtttattc ataaaaagaa 4070
aaaagaattt ataccttttg ccccttttat gaacttatcg gctatcatta tttatctcgt 4130
caaataattac ggatattaaa aaggggaaaa cataatat ttcccttggt cttcatagaa 4190
gtgcgggtgt ttttacgaac gtttcatcac ttcaaaaaac ttttcgttgg ttttcgccat 4250
catcagctta tcaatcaaga attccattgc atccacttca tccattggat taagaatctt 4310
acgaagaatc cacatttttt gtaattcgtc cgctg 4345

<210> 6

<211> 406

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 6

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

Lys Gln Lys Gly Ser Ile Ile Ala Asp Thr Lys Gln Gln Ala His Phe
20 25 30

Gln Leu Ile Ser Arg Gly Leu Thr His Ile Lys Leu Gln Gln Asn Trp
35 40 45

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

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

Gln Ile Leu Gln Gln Asn Cys Thr Gln Ile Met Leu Asn Lys Trp Leu
85 90 95

Glu Arg Leu Leu Gln Ser Ile Glu Ser Gly Leu Ala Phe Ser Gln Ala
100 105 110

Ile Glu Gln Gln Gly Lys Tyr Leu Thr Gln Gln Glu Ile Gln Leu Ile
115 120 125

Gln Val Gly Glu Met Thr Gly Lys Leu Ala Val Val Cys Lys Lys Ile
 130 135 140

Ala Thr His Arg Ser Gln Ser Leu Ala Leu Gln Arg Lys Leu Gln Lys
 145 150 155 160

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

Leu Ala Leu Leu Leu Phe Ile Ala Pro Gln Phe Ala Glu Met Tyr Ser
 180 185 190

Gly Asn Asn Ala Glu Leu Pro Thr Ile Thr Ala Ile Leu Leu Ser Ile
 195 200 205

Ser Asn Phe Leu Lys Gln Asn Ile Gly Ile Leu Leu Phe Phe Val Leu
 210 215 220

Ser Phe Phe Leu Phe Tyr Tyr Phe Tyr Leu Lys Arg Gln Thr Trp Phe
 225 230 235 240

His Gln Lys Lys Asn Gln Leu Ile Ser Ile Thr Pro Ile Phe Gly Thr
 245 250 255

Ile Gln Lys Leu Ser Arg Leu Val Asn Phe Ser Gln Ser Leu Gln Ile
 260 265 270

Met Leu Gln Ala Gly Val Pro Leu Asn Gln Ala Leu Asp Ser Phe Leu
 275 280 285

Pro Arg Thr Gln Thr Trp Gln Thr Lys Lys Thr Leu Val Asn Asp Met
 290 295 300

Val Leu Asp Lys Glu Val Arg Ser Ile Leu Gln Trp Val Ser Gln Gly
 305 310 315 320

Tyr Ala Phe Ser Asn Ser Val Ser Ser Asp Leu Phe Pro Met Glu Ala
 325 330 335

Gln Gln Met Leu Gln Ile Gly Glu Gln Ser Gly Lys Leu Ala Leu Met
 340 345 350

Leu Glu His Ile Ala Asp Asn Tyr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Ile
355 360 365

Asp Leu Leu Ser Gln Met Leu Glu Pro Leu Met Met Val Ile Ile Gly
370 375 380

Ser Leu Ile Gly Ile Ile Met Met Gly Met Tyr Leu Pro Ile Phe Asn
385 390 395 400

Met Gly Ser Val Ile Gln
405

<210> 7

<211> 4345

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (3457)..(4149)

<400> 7

```

gcgatcatta aaattgacat attgcgtaat tcgcccattt cgttcgatca aacaatgtgc      60
tgaaacacgc atttgataaa tttctgcaaa ataaggatga atcttaggat ctaattttcc      120
ttgaaaaaaa tcatccacat atccgcccgc aaattgttct ggcggcagac taatataatg      180
aataaccaat aaggaaatat cctgtggatt tgggcgttta tcgaagtgaag gtgactgaat      240

ttgccgacaa tccaatatac cttgttcaat atcttttagt ttttgcatac ttttttcctt      300
tttttgcgat caggatcgca gaaaaagtgc ggtcaatttt acaaacaaat ttttcctttt      360
cacaatgtcg tcgctaacaa aggcttaata aaaggaaaat gaatgaaact aacaacacag      420
caaaccttga aaaaagggtt tacattaata gagctaata ttgtgattgc aattattgct      480
attttagcca ctatcgcaat tccctcttat caaaattata ctaaaaaagc agcgggtatct      540

```

gaattactgc aagcgtcagc gccttataag gctgatgtgg aattatgtgt atatagcaca	600
aatgaaacaa caaactgtac ggggtgaaaa aatgggtattg cagcagatat aaccacagca	660
aaaggctatg taaaatcagt gacaacaagc aacgggtgcaa taacagtaaa aggggatggc	720
acattggcaa atatggaata tatttttgcaa gctacaggta atgctgcaac aggtgtaact	780
tggacaacaa cttgcaaagg aacggatgcc tctttatttc cagcaaattt ttgcggaagt	840
gtcacacaat gacgagctat gctttacttc atactcagcg tgtaaccgct caaaatggcg	900
agatctttac gatctcgcca gatttatggg aacgcaatca gcagcaacaa tccttgctct	960
tgcggtattt tgctttgcca cttaaagaag aaaataatcg tctttggcta ggggttgatt	1020
ctctctccaa tctttcagct tgtgaaacca ttgcgtttat aacaggaaaa cctgtcgaac	1080
caattttgtt agaaagcagc caactcaaag aactgttaca acaacttact ccgcacaaaa	1140
tgcaagtgga agagcaagtt aaattctatc aacatcaaga aaccattttt gaacaagaag	1200
atgatgaacc tgttatccgc ttacttaatc agatttttga atctgcctta caaaaaatg	1260
cctctgatat tcatttagaa accttggtg atcagtttca agtgcggttt agaattgatg	1320
gtgttttaca accacaaccc ttaataagca aaatatcgcc caatcgattt atttcacgct	1380
taaaattact ggctaaatta gatattagtg aaaatcgact tccacaagat ggacgatttc	1440
aatttaaaac cactttttcc gatattcttg attttcgctt ttcaacctta ccaaccatt	1500
ggggcgaaaa aatcgtgttg cgagcgcaac aaaataaacc tgtagaactt agctttgctg	1560
aactgggtat gaccgaaaat cagcaacaag catttcaacg ctcaacttgc cagccacaag	1620
gattaatttt agtaaccggc cccacaggaa gtgggaaaag tatctcgctt tacaccgcac	1680
ttcagtggct aaatacgctt gataaacata ttatgaccgc tgaagatccc attgaaattg	1740
aacttgatgg tattattcaa agccaaatta atccgcagat tggattagat tttagccgtc	1800
tattgcgtgc ttttttacgt caagatcccg acatcattat gctaggtgaa attcgagatg	1860
aagaaagtgc aaggattgca ctacgtgccg ctcaaacggg acatttggtg ctttcaactt	1920
tacataccaa tgatgcaata tctgccattt ctcgcttaca acaactcggg attcaacaac	1980
atgaaattga aaacagttta ctactcgtca ttgcacagcg tcttgtagca aaaatctgtc	2040
caaagtgcgg tggaaattta ataaattctt gtgattgcc acaaggttat cgagggcgaa	2100
tcggcgtgta tcaatttcta cattggcaac agaattggcta tcaaacggat tttgagaatt	2160
tacgagagag tggtttgga aaagttagcc aaggcataac agatgagaaa gaaattgaac	2220
gtgtgttagg taaaaactca tgactaaaaa actcttttat tatcaaggta gtaacgcatt	2280
aaatcagaaa caaaaaggct caattattgc ggatacgaaa caacaagcgc actttcagtt	2340
aataagccgc gggcttactc acatcaaatt acaacaaaac tggcaatttg gggcaaaacc	2400

caaaaattca gaaatcagtg aattactcaa tcaattagcg acattgctac agtccgtaat	2460
tccgttaaaa aacagcctac aaattttgca acaaaaattgt actcaaatta tgctcaacaa	2520
atggccttgaa cgactgcttc aatccattga atctggctta gcattctcac aagccattga	2580
acaacaagga aaatatctca cacaacaaga aattcaactg attcaagtgg gagaaatgac	2640
aggaaaactt gccgtagttt gtaaaaaaat agccacgcac cgtagtcaat ctttggcttt	2700
acaacgcaaa ttacagaaaa ttatgttata tccctcaatg gtattgggaa tttctctatt	2760
attgacactc gcattactgc tttttatcgc gcctcaattt gctgaaatgt acagtggcaa	2820
taatgcggag ttaccaacaa taaccgcaat attgctctca atatctaatt tccttaagca	2880
aaatattggc attttgcctat ttttcgtttt gagttttttt ctattttatt atttctatct	2940
aaaacgccag acttgggtttc atcaaaagaa aaatcaactt atttctatca cgcctatttt	3000
tggcacaatt caaaagcttt cacgtttagt gaactttagt caaagtttac aaattatggt	3060
gcaggccggc gtaccgctta atcaggcact agacagtttt cttcctcgca cacaacttg	3120
gcaaaccaag aaaacgcttg taaacgatat ggtattagat aaagaagtgc ggtcaatttt	3180
gcaatgggtt tctcaaggct atgcgttttc taatagcgta agtagcgatc ttttcccgat	3240
ggaagcacia caaatgctac aaattggcga acaaagcgga aaactcgctt tgatgctaga	3300
gcatatcgca gataattacc aagaaaaact taatcatcaa attgacttac tctcaciaat	3360
gctagaacca ttaatgatgg taatcatcgg cagtctgatt gggattatta tgatgggaat	3420
gtatttacct atctttaata tgggatcagt tattca atg att tac ttc aca atg	3474
	Met Ile Tyr Phe Thr Met
	1 5
ttt tta tta ggc ggc atc tta ggg atc gca ttg tgg ttc tac cta tct	3522
Phe Leu Leu Gly Gly Ile Leu Gly Ile Ala Leu Trp Phe Tyr Leu Ser	
	10 15 20
ggg ttt att acg cat ttg cag caa gag att tat gcg act tac gtt gaa	3570
Gly Phe Ile Thr His Leu Gln Gln Glu Ile Tyr Ala Thr Tyr Val Glu	
	25 30 35
tta ttt cca caa aac agt tct cca ttt caa ccg cac ttt gcc tct att	3618
Leu Phe Pro Gln Asn Ser Ser Pro Phe Gln Pro His Phe Ala Ser Ile	
	40 45 50
caa caa aaa aag tgc ggt cat att ttg agg tat ttt ttt agt att ggg	3666
Gln Gln Lys Lys Cys Gly His Ile Leu Arg Tyr Phe Phe Ser Ile Gly	
	55 60 65 70
ggt gga ttt ata ttt tta caa att gcc ttc aaa gat tct att ttt act	3714
Val Gly Phe Ile Phe Leu Gln Ile Ala Phe Lys Asp Ser Ile Phe Thr	
	75 80 85
gta tgg atc gga ctc aca ctt att att ctt tgg aca atc agt tat ctt	3762
Val Trp Ile Gly Leu Thr Leu Ile Ile Leu Trp Thr Ile Ser Tyr Leu	
	90 95 100

gat tgg cac tat caa ctt att tct acg aca ccc tgt tta tgg tta ctt	3810
Asp Trp His Tyr Gln Leu Ile Ser Thr Thr Pro Cys Leu Trp Leu Leu	
105 110 115	
act ctc ggt tta ttt ggc gca gac aat aac ttt tca ttg cta acg tta	3858
Thr Leu Gly Leu Phe Gly Ala Asp Asn Asn Phe Ser Leu Leu Thr Leu	
120 125 130	
tct gaa agc ata aaa agt gcg gct agt ttt ttt att gtt ttc tac gca	3906
Ser Glu Ser Ile Lys Ser Ala Ala Ser Phe Phe Ile Val Phe Tyr Ala	
135 140 145 150	
atc tat tgg att gca aaa tgt tat tat aga aaa gaa gcc ttt gga cgg	3954
Ile Tyr Trp Ile Ala Lys Cys Tyr Tyr Arg Lys Glu Ala Phe Gly Arg	
155 160 165	
gga gat tat tgg cta gca atg gca tta gga agt ttt att cat tta gaa	4002
Gly Asp Tyr Trp Leu Ala Met Ala Leu Gly Ser Phe Ile His Leu Glu	
170 175 180	
acc tta ccg cac ttt tta tta tta gcc tca gtg ctt gga ata tgt ttt	4050
Thr Leu Pro His Phe Leu Leu Leu Ala Ser Val Leu Gly Ile Cys Phe	
185 190 195	
tcg ctt att cat aaa aag aaa aaa gaa ttt ata cct ttt gcc cct ttt	4098
Ser Leu Ile His Lys Lys Lys Lys Glu Phe Ile Pro Phe Ala Pro Phe	
200 205 210	
atg aac tta tcg gct atc att att tat ctc gtc aaa tat tac gga tat	4146
Met Asn Leu Ser Ala Ile Ile Ile Tyr Leu Val Lys Tyr Tyr Gly Tyr	
215 220 225 230	
taa aaaggggaaa acataatatt tttcccttgt tcttcataga agtgcggttg	4199
tttttacgaa cgtttcatca cttcaaaaaa ctcttcgttg gttttcgcca tcatcagctt	4259
atcaatcaag aattccattg catccacttc atccattgga ttaagaatct tacgaagaat	4319
ccacattttt tgtaattcgt ccgctg	4345

<210> 8

<211> 230

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 8

Met	Ile	Tyr	Phe	Thr	Met	Phe	Leu	Leu	Gly	Gly	Ile	Leu	Gly	Ile	Ala
1				5					10					15	

Leu Trp Phe Tyr Leu Ser Gly Phe Ile Thr His Leu Gln Gln Glu Ile
 20 25 30

Tyr Ala Thr Tyr Val Glu Leu Phe Pro Gln Asn Ser Ser Pro Phe Gln
 35 40 45

Pro His Phe Ala Ser Ile Gln Gln Lys Lys Cys Gly His Ile Leu Arg
 50 55 60

Tyr Phe Phe Ser Ile Gly Val Gly Phe Ile Phe Leu Gln Ile Ala Phe
 65 70 75 80

Lys Asp Ser Ile Phe Thr Val Trp Ile Gly Leu Thr Leu Ile Ile Leu
 85 90 95

Trp Thr Ile Ser Tyr Leu Asp Trp His Tyr Gln Leu Ile Ser Thr Thr
 100 105 110

Pro Cys Leu Trp Leu Leu Thr Leu Gly Leu Phe Gly Ala Asp Asn Asn
 115 120 125

Phe Ser Leu Leu Thr Leu Ser Glu Ser Ile Lys Ser Ala Ala Ser Phe
 130 135 140

Phe Ile Val Phe Tyr Ala Ile Tyr Trp Ile Ala Lys Cys Tyr Tyr Arg
 145 150 155 160

Lys Glu Ala Phe Gly Arg Gly Asp Tyr Trp Leu Ala Met Ala Leu Gly
 165 170 175

Ser Phe Ile His Leu Glu Thr Leu Pro His Phe Leu Leu Leu Ala Ser
 180 185 190

Val Leu Gly Ile Cys Phe Ser Leu Ile His Lys Lys Lys Lys Glu Phe
 195 200 205

Ile Pro Phe Ala Pro Phe Met Asn Leu Ser Ala Ile Ile Ile Tyr Leu
 210 215 220

Val Lys Tyr Tyr Gly Tyr
 225 230

<210> 9
 <211> 4864
 <212> ADN
 <213> *H. influenzae*

<220>
 <221> CDS
 <222> (517) .. (1314)

<400> 9

tacgaataat ggttttttct ggggttaaga aaaagttacg cgctaattgt tgagtaatcg	60
tacttgcacc ttgtgatgca ccgccattac tcaactgcgac aaacaatgca cgagcaatgc	120
cgataggggtc taatccgtga tgatcgtaaa aacgattgtc ttccgttgct aaaaatgcgt	180
caattaagcg ttgtggcaca tcggctaatt tcaactggaat acggcgttgc tcgcccactt	240
cgccaattaa tttaccgtca gccgtataaa tctgcattgg ttgttgtaat tcaacggttc	300
ttaatgtttc tactgagggc aattccgatt ttaggtggaa atacaacatt ccgccagcca	360
ctaaacctaa aatacataaa gttaataggg tgtttaatat taattttgcg atccgcacgc	420
taaaattctc gcttgggttaa tgaatattct tgtcaagaga cctatgattt agttgttaag	480
tataaaagat tcagccttta aagaatagga aagaat atg caa ttc tcc ctg aaa	534
Met Gln Phe Ser Leu Lys	
1 5	
aat tac cgc act tta caa atc ggc att cat cgt aag cag ggt tat ttt	582
Asn Tyr Arg Thr Leu Gln Ile Gly Ile His Arg Lys Gln Gly Tyr Phe	
10 15 20	
gat ttt gtg tgg ttt gat gat ctt gaa cag cca caa agt tat caa att	630
Asp Phe Val Trp Phe Asp Asp Leu Glu Gln Pro Gln Ser Tyr Gln Ile	
25 30 35	
ttt gtt aat gat cgt gat ttt aaa aat cgt ttt tta caa cag cta aaa	678
Phe Val Asn Asp Arg Asp Phe Lys Asn Arg Phe Leu Gln Gln Leu Lys	
40 45 50	
aca caa tat caa ggg aaa acc ttt cct tta cag ttt gtg gca agc att	726
Thr Gln Tyr Gln Gly Lys Thr Phe Pro Leu Gln Phe Val Ala Ser Ile	
55 60 65 70	
ccc gct cac tta act tgg tcg aaa gta tta atg ttg cca caa gtg tta	774
Pro Ala His Leu Thr Trp Ser Lys Val Leu Met Leu Pro Gln Val Leu	
75 80 85	

aat gcg caa gaa tgt cat caa caa tgt aaa ttt gtg att gaa aaa gag Asn Ala Gln Glu Cys His Gln Gln Cys Lys Phe Val Ile Glu Lys Glu 90 95 100	822
ctg cct att tct tta aat gaa tta tgg ttt gat tat cgt tct acc tcg Leu Pro Ile Ser Leu Asn Glu Leu Trp Phe Asp Tyr Arg Ser Thr Ser 105 110 115	870
tta aag caa ggt ttt cga tta gac gtt act gca att cgt aaa agt act Leu Lys Gln Gly Phe Arg Leu Asp Val Thr Ala Ile Arg Lys Ser Thr 120 125 130	918
gct caa act tat ttg caa gat ttt cag cca ttt aaa att aat gta ttg Ala Gln Thr Tyr Leu Gln Asp Phe Gln Pro Phe Lys Ile Asn Val Leu 135 140 145 150	966
gat gtt gcg tca aat gct att ttg cgt gca ttt cag tat ttg ttg aat Asp Val Ala Ser Asn Ala Ile Leu Arg Ala Phe Gln Tyr Leu Leu Asn 155 160 165	1014
gaa caa gtg cgg tca gaa aat acc tta ttt tta ttt caa gaa gat gac Glu Gln Val Arg Ser Glu Asn Thr Leu Phe Leu Phe Gln Glu Asp Asp 170 175 180	1062
tat tgt ttg gcg atc tgt gaa aga tcg cag caa tcg caa att tta caa Tyr Cys Leu Ala Ile Cys Glu Arg Ser Gln Gln Ser Gln Ile Leu Gln 185 190 195	1110
tct cac gaa aat ttg acc gca ctt tat gaa caa ttt acc gaa cgt ttt Ser His Glu Asn Leu Thr Ala Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Glu Arg Phe 200 205 210	1158
gaa gga caa ctt gaa caa gtt ttt gtt tat caa att ccc tca agt cat Glu Gly Gln Leu Glu Gln Val Phe Val Tyr Gln Ile Pro Ser Ser His 215 220 225 230	1206
aca cca tta ccc gaa aac tgg cag cga gta gaa aca gaa ctc cct ttt Thr Pro Leu Pro Glu Asn Trp Gln Arg Val Glu Thr Glu Leu Pro Phe 235 240 245	1254
att gcg ctt ggc aac gcg cta tgg caa aaa gat tta cat caa caa aaa Ile Ala Leu Gly Asn Ala Leu Trp Gln Lys Asp Leu His Gln Gln Lys 250 255 260	1302
gtg ggt ggt taa atgtcgatga atttattgcc ttggcgctact tatcaacatc Val Gly Gly 265	1354
aaaagcgttt acgtcgttta gctttttata tcgctttatt tatcttgctt gctattaatt	1414
taatgttggc ttttagcaat ttgattgaac aacagaaaca aaatttgcaa gcgcagcaaa	1474
catcttttga acaacttaat cagcaacttc acaaaactac catgcaaatt gatcagttac	1534
gcagtgcggt gaaagttggt gaagttttga catctattcc caacgagcaa gtaaaaaaga	1594
gtttacaaca gctaagttaa ttaccttttc aacaaggaga actgaataaa tttaaacaag	1654
atgccataaa cttaagtttg gaaggtaacg cgcaagatca aacagaattt gaactgattc	1714
atcaattttt aaagaaacat tttccaatg tgaaattaag tcaggttcaa cctgaacaag	1774

atacattggt	ttttcacttt	gatgtggaac	aaggggcgga	aaaatgaaag	cttttttttaa	1834
cgatcctttt	actccttttg	gaaaatggct	aagtcagcct	ttttatgtgc	acggtttaac	1894
ctttttattg	ctattaagtg	cggtgatttt	tcgccccgtt	ttagattata	tcgaggggag	1954
ttcacgtttc	catgaaattg	aaaatgagtt	agcggtgaaa	cgttcagaat	tgttgcatca	2014
acagaaaatt	ttaacttctt	tacagcagca	gtcggaaagt	cgaaaacttt	ctccagaact	2074
ggctgcacaa	attattcctt	tgaataaaca	aattcaacgt	ttagctgcgc	gtaacggttt	2134
atctcagcat	ttacgttggg	aatgggggca	aaagcctatt	ttgcatttac	agcttacagg	2194
tcatttttgag	aaaacgaaga	cattttttaac	cgcacttttg	gctaattcgt	cacagctttc	2254
agtgagtcgc	ttgcagttta	tcaaaccgga	agacaacca	ttgcaaaccg	agatcatttt	2314
tcagctagat	aaggaaacaa	aatgaaacat	tggtttttcc	tgattatatt	attttttatg	2374
aattgcagtt	ggggacaaga	tcctttcgat	aaaacacagc	gtaaccgttc	tcagtttgat	2434
aacgcacaaa	cagtaatgga	gcagacagaa	ataatttcct	cagatgtacc	taataatcta	2494
tgcgagcg	atgaaaatcg	ccaagcggct	gaaattcctt	tgaacgcttt	aaaattggtg	2554
ggcgtagtga	tttctaaaga	taaagccttt	gccttggtgc	aagatcaagg	tttgcaaatt	2614
tacagcgttt	tagagggcgt	tgatgtggct	caagagggct	atattgtaga	aaaaatcaac	2674
caaaacaatg	ttcaatttat	gcgtaagctc	ggagagcaat	gtgatagtag	tgaatggaaa	2734
aaattaagtt	tttaaaggaa	gattatgaag	aaatatTTTT	taaagtgcgg	ttatttttta	2794
gtgtgttttt	gtttgccatt	aatcgTTTT	gctaattccta	aaacagataa	cgaatgtttt	2854
tttattcgtt	tatcgcaagc	acctttagct	caaacactgg	agcaattagc	ttttcaacaa	2914
gatgtgaatt	tagtgatggg	tgagagggtta	gaaggcaata	tttctttgaa	attaaacaat	2974
attgatatgc	cacgtttgct	aaaaataatc	gcaaaaagta	agcatcttac	tttgaataaa	3034
gatgatgggg	tttattattt	aaacggcagt	caatctggca	aaggccaagt	tcgaggaaat	3094
cttacgacaa	atgaaccgca	cttagtcagc	cacacggtaa	aacttcattt	tgctaaagcc	3154
tctgaattaa	tgaaatcctt	aacaacagga	agtggatcct	tgctttcttc	tcgggggagc	3214
attacctttg	atgatcgag	taatttgctg	gttatcagg	atgaacctcg	ttttgtgcaa	3274
aatatcaaaa	aactgattgc	tgaaatggat	aagcctattg	aacagatcgc	tattgaagcg	3334
cgaattgtga	caattacgga	tgagagtttg	aaagaacttg	gcgttcgggtg	ggggattttt	3394
aatccaactg	aaaatgcaag	acgagttgcg	ggcagcctta	caggcaatag	ctttgaaaat	3454
attgoggata	atcttaatgt	aaattttgcg	acaacgacga	cacctgctgg	ctctatagca	3514
ttacaagtcg	cgaaaattaa	tgggcgattg	cttgatttag	aattgagtgc	gttgagcgt	3574

gaaaataatg tagaaattat tgcaagtcct cgcttactca ctaccaataa gaaaagtgcg	3634
agcattaaac aggggacaga aattccttac atcgtgagta atactcgtaa cgatacgcaa	3694
tctgtggaat ttcgtgaggc agtacttggg ttggaagtga cgccacatat ttctaaagat	3754
aacaatatct tacttgattt attggttaagt caaaattccc ctggttctcg tgcgcttat	3814
ggacaaaatg aggtggtttc tattgataag caagaaatta atactcaggt ttttgccaaa	3874
gatggggaaa ccattgtgct tggcggcgta tttcacgaca caatcacgaa aagcgaagat	3934
aaagtgccat tgcttggcga tatacccggt attaaacgat tatttagcaa agaaagtgaa	3994
cgacatcaaa aacgtgagct cgtgattttc gtcacgcgcg atattttaaa agcaggagaa	4054
acgttagagg cgttgaaaca aaaaagtgcg gggaaaaaat aactttttta gacgatgaat	4114
ttttttaatt ttcgctgtat ccactgtcgt ggcaatcttc atattgcaaa aaatgggcta	4174
tggtcaggtt gccaaaaaca aattaaatct tttccttatt gcggtcattg tgggtcggaa	4234
ttgcaatatt atgcgcagca ttgtggtaat tgtcttaaac aagaaccaag ttgggataag	4294
atggtcatta ttgggcatta tattgaacct ctttcgatat tgattcaccg ttttaaattt	4354
caaatcaat tttggattga ccgcacttta gctcggtttt tatactctgc ggtgcgtgat	4414
gctaaacgaa cgcacaaact taaattgccg gaagcaatca ttccagtgcc tttatatcat	4474
tttcgtcagt ggcgacgggg ttataatcag gcagatttat tatctcggca attaatgcgc	4534
tggctggata ttcctaattt gagcaatatc gtaaagcgtg tgaaacacac ctatactcaa	4594
cgtggtttga gtgcaaaaga tcgtcgtcag aatttaaaaa atgccttttc tcttggtggt	4654
tcgaaaaatg aatttcctta tcgccgtggt gcgttggtgg atgatgtgat tactactggt	4714
tctacactca atgaaatctc aaaattgttg cgaaaattag gtgtggagga gattcaagtg	4774
tgggggctgg cacgagctta atataaagca ctggaaaaaa aagcgcgata agcgtattat	4834
tcccgatact ttctctcaag tatttaggac	4864

<210> 10

<211> 265

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 10

Met	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Asn	Tyr	Arg	Thr	Leu	Gln	Ile	Gly	Ile	His
1				5				10						15	

Arg Lys Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Val Trp Phe Asp Asp Leu Glu Gln
 20 25 30

Pro Gln Ser Tyr Gln Ile Phe Val Asn Asp Arg Asp Phe Lys Asn Arg
 35 40 45

Phe Leu Gln Gln Leu Lys Thr Gln Tyr Gln Gly Lys Thr Phe Pro Leu
 50 55 60

Gln Phe Val Ala Ser Ile Pro Ala His Leu Thr Trp Ser Lys Val Leu
 65 70 75 80

Met Leu Pro Gln Val Leu Asn Ala Gln Glu Cys His Gln Gln Cys Lys
 85 90 95

Phe Val Ile Glu Lys Glu Leu Pro Ile Ser Leu Asn Glu Leu Trp Phe
 100 105 110

Asp Tyr Arg Ser Thr Ser Leu Lys Gln Gly Phe Arg Leu Asp Val Thr
 115 120 125

Ala Ile Arg Lys Ser Thr Ala Gln Thr Tyr Leu Gln Asp Phe Gln Pro
 130 135 140

Phe Lys Ile Asn Val Leu Asp Val Ala Ser Asn Ala Ile Leu Arg Ala
 145 150 155 160

Phe Gln Tyr Leu Leu Asn Glu Gln Val Arg Ser Glu Asn Thr Leu Phe
 165 170 175

Leu Phe Gln Glu Asp Asp Tyr Cys Leu Ala Ile Cys Glu Arg Ser Gln
 180 185 190

Gln Ser Gln Ile Leu Gln Ser His Glu Asn Leu Thr Ala Leu Tyr Glu
 195 200 205

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

Gln Ile Pro Ser Ser His Thr Pro Leu Pro Glu Asn Trp Gln Arg Val
 225 230 235 240

Glu Thr Glu Leu Pro Phe Ile Ala Leu Gly Asn Ala Leu Trp Gln Lys
245 250 255

Asp Leu His Gln Gln Lys Val Gly Gly
260 265

<210> 11

<211> 4864

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1321)..(1821)

<400> 11

tacgaataat gggtttttct ggggttaaga aaaagttacg cgctaattgt tgagtaatcg	60
tacttgacc ttgtgatgca ccgccattac tcaactgcgac aaacaatgca cgagcaatgc	120
cgataggggtc taatccgtga tgatcgtaaa aacgattgtc ttccgttgct aaaaatgcgt	180
caattaagcg ttgtggcaca tcggctaatt tcaactggaat acggcggtgc tcgcccactt	240
cgccaattaa tttaccgtca gccgtataaa tctgcattgg ttgttgtaat tcaacggttc	300
ttaatgtttc tactgagggc aattccgatt ttaggtggaa atacaacatt ccgccagcca	360
ctaaacctaa aatacataaa gttaataggg tgtttaatat taattttgcg atccgcacg	420
taaaattctc gcttgggttaa tgaatattct tgtcaagaga cctatgattt agttgttaag	480
tataaaagat tcagccttta aagaatagga aagaatatgc aattctccct gaaaaattac	540
cgcactttac aaatcggcat tcatcgtaag cagggttatt ttgattttgt gtggtttgat	600
gatcttgaac agccacaaag ttatcaaatt tttgttaatg atcgtgattt taaaaatcgt	660
tttttacaac agctaaaaac acaatatcaa gggaaaacct ttcttttaca gtttgtggca	720
agcattcccg ctcaacttaac ttggtcgaaa gtattaatgt tgccacaagt gttaaatgcg	780
caagaatgtc atcaacaatg taaatttgtg attgaaaaag agctgcctat ttcttttaat	840

gaattatggg	ttgattatcg	ttctacctcg	ttaaagcaag	gttttcgatt	agacgttact	900
gcaattcgta	aaagtactgc	tcaaacttat	ttgcaagatt	ttcagccatt	taaaattaat	960
gtattggatg	ttgcgtcaaa	tgctattttg	cgtgcatttc	agtatttggt	gaatgaacaa	1020
gtgcggtcag	aaaatacctt	atTTTTattt	caagaagatg	actattgttt	ggcgatctgt	1080
gaaagatcgc	agcaatcgca	aattttacaa	tctcacgaaa	atttgaccgc	actttatgaa	1140
caatttaccg	aacgttttga	aggacaactt	gaacaagttt	ttgtttatca	aattccctca	1200
agtcatacac	cattaccgca	aaactggcag	cgagtagaaa	cagaactccc	ttttattgcg	1260
cttggcaacg	cgctatggca	aaaagattta	catcaacaaa	aagtgggtgg	ttaaagtgcg	1320
atg aat tta ttg cct tgg cgt act tat caa cat caa aag cgt tta cgt	1368					
Met Asn Leu Leu Pro Trp Arg Thr Tyr Gln His Gln Lys Arg Leu Arg						
1 5 10 15						
cgt tta gct ttt tat atc gct tta ttt atc ttg ctt gct att aat tta	1416					
Arg Leu Ala Phe Tyr Ile Ala Leu Phe Ile Leu Leu Ala Ile Asn Leu						
20 25 30						
atg ttg gct ttt agc aat ttg att gaa caa cag aaa caa aat ttg caa	1464					
Met Leu Ala Phe Ser Asn Leu Ile Glu Gln Gln Lys Gln Asn Leu Gln						
35 40 45						
gcg cag caa aca tct ttt gaa caa ctt aat cag caa ctt cac aaa act	1512					
Ala Gln Gln Thr Ser Phe Gln Gln Leu Asn Gln Gln Leu His Lys Thr						
50 55 60						
acc atg caa att gat cag tta cgc agt gcg gtg aaa gtt ggt gaa gtt	1560					
Thr Met Gln Ile Asp Gln Leu Arg Ser Ala Val Lys Val Gly Glu Val						
65 70 75 80						
ttg aca tct att ccc aac gag caa gta aaa aag agt tta caa cag cta	1608					
Leu Thr Ser Ile Pro Asn Glu Gln Val Lys Lys Ser Leu Gln Gln Leu						
85 90 95						
agt gaa tta cct ttt caa caa gga gaa ctg aat aaa ttt aaa caa gat	1656					
Ser Glu Leu Pro Phe Gln Gln Gly Glu Leu Asn Lys Phe Lys Gln Asp						
100 105 110						
gcc aat aac tta agt ttg gaa ggt aac gcg caa gat caa aca gaa ttt	1704					
Ala Asn Asn Leu Ser Leu Glu Gly Asn Ala Gln Asp Gln Thr Glu Phe						
115 120 125						
gaa ctg att cat caa ttt tta aag aaa cat ttt ccc aat gtg aaa tta	1752					
Glu Leu Ile His Gln Phe Leu Lys Lys His Phe Pro Asn Val Lys Leu						
130 135 140						
agt cag gtt caa cct gaa caa gat aca ttg ttt ttt cac ttt gat gtg	1800					
Ser Gln Val Gln Pro Glu Gln Asp Thr Leu Phe Phe His Phe Asp Val						
145 150 155 160						
gaa caa ggg gcg gaa aaa tga aagctttttt taacgatcct tttactcctt	1851					
Glu Gln Gly Ala Glu Lys						
165						
ttggaaaatg gctaagtcag ccttttttatg tgcacggttt aaccttttta ttgctattaa	1911					
gtgcgggtgat ttttcgcccc gtttttagatt atatcgaggg gagttcacgt ttccatgaaa	1971					

ttgaaaatga gtttagcgggtg aaacggttcag aattgttgca tcaacagaaa atttttaactt	2031
ctttacagca gcagtcggaa agtcgaaaac tttctccaga actggctgca caaattattc	2091
ctttgaataa acaaattcaa cgtttagctg cgcgtaacgg tttatctcag cattttacgtt	2151
gggaaatggg gcaaaagcct attttgcatt tacagcttac aggtcatttt gagaaaaacga	2211
agacattttt aaccgcactt ttggctaatt cgtcacagct ttcagtgagt cgcttgagct	2271
ttatcaaacc cgaagacaac ccattgcaaa ccgagatcat ttttcagcta gataaggaaa	2331
caaaatgaaa cattgggtttt tcctgattat attatttttt atgaattgca gttggggaca	2391
agatcctttc gataaaacac agcgttaaccg ttctcagttt gataacgcac aaacagtaat	2451
ggagcagaca gaaataattt cctcagatgt accttaataat ctatgcggag cggatgaaaa	2511
tcgccaaagcg gctgaaattc ctttgaacgc tttaaaattg gtgggcgtag tgattttctaa	2571
agataaagcc tttgccttgt tgcaagatca aggtttgcaa atttacagcg ttttagaggg	2631
cgttgatgtg gctcaagagg gctatattgt agaaaaaatc aaccaaaaca atgttcaatt	2691
tatgcgtaag ctccggagagc aatgtgatag tagtgaatgg aaaaaattaa gtttttaaaag	2751
gaagattatg aagaaatatt ttttaaagtg cggttatttt ttagtgtgtt tttgtttgcc	2811
attaatcggt tttgctaata ctaaaacaga taacgaatgt ttttttattc gtttatcgca	2871
agcaccttta gctcaaacac tggagcaatt agcttttcaa caagatgtga atttagtgat	2931
gggtgagagg ttagaaggca atatttcttt gaaattaaac aatattgata tgccacgttt	2991
gctaaaaata atcgcaaaaa gtaagcatct tactttgaat aaagatgatg gggtttatta	3051
tttaaacggc agtcaatctg gcaaagggtca agttgcagga aatcttacga caaatgaacc	3111
gcacttagtc agccacacgg taaaacttca ttttgctaaa gcctctgaat taatgaaatc	3171
cttaacaaca ggaagtggat ctttgctttc ttctgcgggg agcattacct ttgatgatcg	3231
cagtaatttg ctggttattc aggatgaacc tcgttttgtg caaaatatca aaaaactgat	3291
tgctgaaatg gataagccta ttgaacagat cgctattgaa gcgcgaattg tgacaattac	3351
ggatgagagt ttgaaagaac ttggcggttcg gtgggggatt tttaatccaa ctgaaaatgc	3411
aagacgagtt gcgggcagcc ttacaggcaa tagctttgaa aatattgcgg ataacttta	3471
tgtaaatttt gcgacaacga cgacacctgc tggctctata gcattacaag tcgcgaaaat	3531
taatgggcga ttgcttgatt tagaattgag tgcgttggag cgtgaaaata atgtagaaat	3591
tattgcaagt cctcgcttac tcactaccaa taagaaaagt gcgagcatta aacaggggac	3651
agaaattcct tacatcgtga gtaatactcg taacgatacg caatctgtgg aatttcgtga	3711
ggcagtactt ggtttggaag tgacgccaca tattttctaa gataacaata tcttacttga	3771
tttattggta agtcaaaatt ccctgggttc tcgtgtcgct tatggacaaa atgaggtggt	3831
ttctattgat aagcaagaaa ttaatactca ggtttttgcc aaagatgggg aaaccattgt	3891

gcttggcggc gtatttcacg acacaatcac gaaaagcgaa gataaagtgc cattgcttgg 3951
cgatataccc gttattaaac gattatcttag caaagaaagt gaacgacatc aaaaacgtga 4011
gctcgtgatt ttcgtcacgc cgcataatctt aaaagcagga gaaacgttag aggcgttgaa 4071
acaaaaaagt gcggggaaaa aataactctt ttagacgatg aattttttta attttcgctg 4131
tatccactgt cgtggcaatc ttcataattgc aaaaaatggg ctatgttcag gttgccaaaa 4191
acaaattaaa tcttttcctt attgcgggtca ttgtggtgcg gaattgcaat attatgcgca 4251
gcattgtggg aattgtctta aacaagaacc aagttgggat aagatgggtca ttattgggca 4311
ttatatggaa cctctttcga tattgattca ccgtttttaa tttcaaaatc aattttggat 4371
tgaccgcact ttagctcggc ttttatatct tgccgtgcgt gatgctaaac gaacgcatca 4431
acttaaatg ccagaagcaa tcattccagt gcctttatat cattttcgtc agtggcgacg 4491
gggttataat caggcagatt tattatctcg gcaattaaagt cgctggctgg atattcctaa 4551
tttgagcaat atcgtaaagc gtgtgaaaca cacctatact caacgtgggt tgagtgcaaa 4611
agatcgtcgt cagaatttaa aaaatgcctt ttctcttggt gtttcgaaaa atgaatttcc 4671
ttatcgccgt gttgcgttgg tggatgatgt gattactact gggtctacac tcaatgaaat 4731
ctcaaaattg ttgcgaaaat taggtgtgga ggagattcaa gtgtgggggc tggcacgagc 4791
ttaatataaa gcactggaaa aaaaagcgcg ataagcgtat tattcccgat actttctctc 4851
aagtatttag gac 4864

<210> 12

<211> 166

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 12

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

Arg Leu Ala Phe Tyr Ile Ala Leu Phe Ile Leu Leu Ala Ile Asn Leu
20 25 30

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

Ala Gln Gln Thr Ser Phe Glu Gln Leu Asn Gln Gln Leu His Lys Thr
 50 55 60
 Thr Met Gln Ile Asp Gln Leu Arg Ser Ala Val Lys Val Gly Glu Val
 65 70 75 80
 Leu Thr Ser Ile Pro Asn Glu Gln Val Lys Lys Ser Leu Gln Gln Leu
 85 90 95
 Ser Glu Leu Pro Phe Gln Gln Gly Glu Leu Asn Lys Phe Lys Gln Asp
 100 105 110
 Ala Asn Asn Leu Ser Leu Glu Gly Asn Ala Gln Asp Gln Thr Glu Phe
 115 120 125
 Glu Leu Ile His Gln Phe Leu Lys Lys His Phe Pro Asn Val Lys Leu
 130 135 140
 Ser Gln Val Gln Pro Glu Gln Asp Thr Leu Phe Phe His Phe Asp Val
 145 150 155 160
 Glu Gln Gly Ala Glu Lys
 165

<210> 13

<211> 4864

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1818)..(2339)

<400> 13

tacgaataat ggtttttttct ggggttaaga aaaagttacg cgctaattgt tgagtaatcg 60

tacttgcacc ttgtgatgca cgcgcattac tcaactgcgac aaacaatgca cgagcaatgc	120
cgataggggtc taatccgtga tgatcgtaaa aacgattgtc ttccgttgct aaaaatgcgt	180
caattaagcg ttgtggcaca teggctaatt tcaactggaat acggcggttgc tcgcccactt	240
cgccaattaa tttaccgtca gccgtataaa tctgcattgg ttgttgtaat tcaacgggtc	300
ttaatgtttc tactgagggc aattccgatt ttaggtggaa atacaacatt ccgccagcca	360
ctaaacctaa aatacataaa gttaataggg tgtttaatat taattttgcg atccgcacg	420
taaaattctc gcttggttaa tgaatattct tgcgaagaga cctatgattt agttgttaag	480
tataaaagat tcagccttta aagaatagga aagaatatgc aattctccct gaaaaattac	540
cgcactttac aaatcgcat tcatcgtaag cagggttatt ttgattttgt gtggtttgat	600
gatcttgaac agccacaaag ttatcaaatt ttgttaatg atcgtgattt taaaaatcgt	660
tttttacaac agctaaaaac acaatatcaa gggaaaacct ttccctttaca gtttgtggca	720
agcattcccg ctcaactaac ttggtcgaaa gtattaatgt tgccacaagt gttaaatgcg	780
caagaatgtc atcaacaatg taaatttgtg attgaaaaag agctgcctat ttctttaaat	840
gaattatggg ttgattatcg ttctacctcg ttaaagcaag gttttcgatt agacgttact	900
gcaattcgtc aaagtactgc tcaaacttat ttgcaagatt ttcagccatt taaaattaat	960
gtattggatg ttgcgtcaaa tgctattttg cgtgcatttc agtatttgtt gaatgaacaa	1020
gtgcggtcag aaaatacctt atttttatct caagaagatg actattgttt ggcgatctgt	1080
gaaagatcgc agcaatcgca aattttacaa tctcacgaaa atttgaccgc actttatgaa	1140
caatttaccg aacgttttga aggacaaact gaacaagttt ttgtttatca aattccctca	1200
agtcatacac cattaccoga aaactggcag cgagtagaaa cagaactccc ttttattgcg	1260
cttggcaacg cgctatggca aaaagattta catcaacaaa aagtgggtgg ttaaagtgcg	1320
atgaatttat tgccttggcg tacttatcaa catcaaaaagc gtttacgtcg tttagctttt	1380
tatatcgctt tatttatctt gcttgctatt aatttaaatgt tggcttttag caatttgatt	1440
gaacaacaga aacaaaattt gcaagcgcag caaacatctt ttgaacaact taatcagcaa	1500
cttcacaaaa ctaccatgca aattgatcag ttacgcagtg cggtgaaagt tggatgaagt	1560
ttgacatcta ttcccaacga gcaagtaaaa aagagtttac aacagctaag tgaattacct	1620
tttcaacaag gagaactgaa taaattttaa caagatgccataaacttaag tttggaaggt	1680
aacgcgcaag atcaaacaga atttgaactg attcatcaat ttttaaagaa acattttccc	1740
aatgtgaaat taagtcaggt tcaacctgaa caagatacat tgttttttca ctttgatgtg	1800
gaacaagggg cggaaaa atg aaa gct ttt ttt aac gat cct ttt act cct	1850
Met Lys Ala Phe Phe Asn Asp Pro Phe Thr Pro	
1 5 10	

ttt gga aaa tgg cta agt cag cct ttt tat gtg cac ggt tta acc ttt Phe Gly Lys Trp Leu Ser Gln Pro Phe Tyr Val His Gly Leu Thr Phe 15 20 25	1898
tta ttg cta tta agt gcg gtg att ttt cgc ccc gtt tta gat tat atc Leu Leu Leu Leu Ser Ala Val Ile Phe Arg Pro Val Leu Asp Tyr Ile 30 35 40	1946
gag ggg agt tca cgt ttc cat gaa att gaa aat gag tta gcg gtg aaa Glu Gly Ser Ser Arg Phe His Glu Ile Glu Asn Glu Leu Ala Val Lys 45 50 55	1994
cgt tca gaa ttg ttg cat caa cag aaa att tta act tct tta cag cag Arg Ser Glu Leu Leu His Gln Gln Lys Ile Leu Thr Ser Leu Gln Gln 60 65 70 75	2042
cag tcg gaa agt cga aaa ctt tct cca gaa ctg gct gca caa att att Gln Ser Glu Ser Arg Lys Leu Ser Pro Glu Leu Ala Ala Gln Ile Ile 80 85 90	2090
cct ttg aat aaa caa att caa cgt tta gct gcg cgt aac ggt tta tct Pro Leu Asn Lys Gln Ile Gln Arg Leu Ala Ala Arg Asn Gly Leu Ser 95 100 105	2138
cag cat tta cgt tgg gaa atg ggg caa aag cct att ttg cat tta cag Gln His Leu Arg Trp Glu Met Gly Gln Lys Pro Ile Leu His Leu Gln 110 115 120	2186
ctt aca ggt cat ttt gag aaa acg aag aca ttt tta acc gca ctt ttg Leu Thr Gly His Phe Glu Lys Thr Lys Thr Phe Leu Thr Ala Leu Leu 125 130 135	2234
gct aat tcg tca cag ctt tca gtg agt cgc ttg cag ttt atc aaa ccc Ala Asn Ser Ser Gln Leu Ser Val Ser Arg Leu Gln Phe Ile Lys Pro 140 145 150 155	2282
gaa gac aac cca ttg caa acc gag atc att ttt cag cta gat aag gaa Glu Asp Asn Pro Leu Gln Thr Glu Ile Ile Phe Gln Leu Asp Lys Glu 160 165 170	2330
aca aaa tga aacattggtt tttcctgatt atattatattt ttatgaattg Thr Lys	2379
cagttgggga caagatcctt tcgataaaaac acagcgtaac cgttctcagt ttgataacgc	2439
acaaacagta atggagcaga cagaaataat ttctctcagat gtacctaata atctatgcgg	2499
agcggatgaa aatcgccaag cggttgaaat tcctttgaac gctttaaaat tgggtgggcgt	2559
agtgattttct aaagataaag cctttgcctt gttgcaagat caagggtttgc aaattttacag	2619
cgtttttagag ggcgttgatg tggtcaaga gggctatatt gtagaaaaaa tcaacaaaaa	2679
caatgttcaa tttatgcgta agctcggaga gcaatgtgat agtagtgaat ggaaaaaatt	2739
aagtttttaa aggaagatta tgaagaaata ttttttaaag tgcggttatt ttttagtgtg	2799
tttttgtttg ccattaatcg tttttgctaa tcttaaaaca gataacgaat gtttttttat	2859

tcgtttatcg	caagcacctt	tagctcaaac	actggagcaa	ttagcttttc	aacaagatgt	2919
gaatttagtg	atgggtgaga	ggttagaagg	caatatttct	ttgaaattaa	acaatattga	2979
tatgccacgt	ttgctaaaaa	taatcgcaaa	aagtaagcat	cttactttga	ataaagatga	3039
tggggtttat	tatttaaacg	gcagtcaatc	tggcaaaggt	caagttgcag	gaaatcttac	3099
gacaaatgaa	ccgcacttag	tcagccacac	ggtaaaactt	cattttgcta	aagcctctga	3159
attaatgaaa	tccttaacaa	caggaagtgg	atctttgctt	tcttctgcgg	ggagcattac	3219
ctttgatgat	cgcagtaatt	tgctggttat	tcaggatgaa	cctcgttttg	tgcaaaatat	3279
caaaaaactg	attgctgaaa	tggataagcc	tattgaacag	atcgctattg	aagcgcgaat	3339
tgtgacaatt	acggatgaga	gtttgaaaga	acttggcggt	cgggtggggga	tttttaatcc	3399
aactgaaaat	gcaagacgag	ttgcgggcag	ccttacaggc	aatagctttg	aaaatattgc	3459
ggataatctt	aatgtaaatt	ttgcgacaac	gacgacacct	gctggctcta	tagcattaca	3519
agtcgcgaaa	attaatgggc	gattgcttga	tttagaattg	agtgcgttgg	agcgtgaaaa	3579
taatgtagaa	attattgcaa	gtcctcgctt	actcactacc	aataagaaaa	gtgcgagcat	3639
taaacagggg	acagaaattc	cttacatcgt	gagtaatact	cgtaacgata	cgcaatctgt	3699
ggaatttcgt	gaggcagtac	ttggtttgga	agtgacgcca	catatttcta	aagataacaa	3759
tatcttactt	gatttattgg	taagtcaaaa	ttcccctggg	tctcgtgtcg	cttatggaca	3819
aatgaggtg	gtttctattg	ataagcaaga	aattaatact	caggtttttg	ccaaagatgg	3879
ggaaaccatt	gtgcttggcg	gcgtatttca	cgacacaatc	acgaaaagcg	aagataaagt	3939
gccattgctt	ggcgatatac	ccgttattaa	acgattatct	agcaaagaaa	gtgaacgaca	3999
tcaaaaacgt	gagctcgtga	ttttcgtcac	gccgcatatt	ttaaaagcag	gagaaacggt	4059
agaggcggtg	aaacaaaaaa	gtgcggggaa	aaaataactt	ttttagacga	tgaatttttt	4119
taattttcgc	tgtatccact	gtcgtggcaa	tcttcatatt	gcaaaaaatg	ggctatgttc	4179
aggttgccaa	aaacaaatta	aatcttttcc	ttattgcggt	cattgtggtg	cgggaattgca	4239
atattatgcg	cagcattgtg	gtaattgtct	taaacaagaa	ccaagttggg	ataagatggt	4299
cattattggg	cattatattg	aacctcttcc	gatattgatt	caccgtttta	aatttcaaaa	4359
tcaattttgg	attgaccgca	ctttagctcg	gcttttatat	cttgcggtgc	gtgatgctaa	4419
acgaacgcat	caacttaaata	tgccagaagc	aatcattcca	gtgcctttat	atcattttcg	4479
tcagtggcga	cgggggtata	atcaggcaga	tttattatct	cggcaattaa	gtcgctggct	4539
ggatattcct	aatttgagca	atatcgtaaa	gcgtgtgaaa	cacacctata	ctcaacgtgg	4599
tttgagtgca	aaagatcgtc	gtcagaattt	aaaaaatgcc	ttttctcttg	ttgtttcgaa	4659
aaatgaattt	ccttatcgcc	gtgttgcggt	ggtggatgat	gtgattacta	ctggttctac	4719

actcaatgaa atctcaaaat tgttgcgaaa attaggtgtg gaggagattc aagtgtgggg 4779
gctggcacga gcttaatata aagcactgga aaaaaaagcg cgataagcgt attattcccg 4839
atactttctc tcaagtatatt aggac 4864

<210> 14

<211> 173

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 14

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

Leu Ser Val Ser Arg Leu Gln Phe Ile Lys Pro Glu Asp Asn Pro Leu
 145 150 155 160

Gln Thr Glu Ile Ile Phe Gln Leu Asp Lys Glu Thr Lys
 165 170

<210> 15

<211> 4864

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (2336)..(2749)

<400> 15

tacgaataat ggttttttct ggggttaaga aaaagttacg cgctaattgt tgagtaatcg	60
tacttgacc ttgtgatgca ccgccattac tctctgcgac aaacaatgca cgagcaatgc	120
cgataggggc taatccgtga tgatcgtaaa aacgattgtc ttccgttgct aaaaatgcgt	180
caattaagcg ttgtggcaca tcggctaatt tctctggaat acggcggtgc tcgcccactt	240
cgccaattaa tttaccgtca gccgtataaa tctgcattgg ttgttgtaat tcaacgggtc	300
ttaatgtttc tactgagggc aattccgatt ttaggtggaa atacaacatt ccgccagcca	360
ctaaacctaa aatacataaa gttaataggg tgtttaatat taattttgcg atccgcatcg	420
taaaattctc gcttggttaa tgaatattct tgtcaagaga cctatgattt agttgttaag	480
tataaaagat tcagccttta aagaatagga aagaatatgc aattctccct gaaaaattac	540
cgcactttac aaatcggcat tcatcgtaag cagggttatt ttgattttgt gtggtttgat	600
gatcttgaac agccacaaag ttatcaaatt tttgttaatg atcgtgattt taaaaatcgt	660
tttttacaac agctaaaaac acaatatcaa gggaaaacct ttcctttaca gtttgtggca	720
agcattcccg ctcaactaac ttggtcgaaa gtattaatgt tgccacaagt gttaaatgcg	780
caagaatgtc atcaacaatg taaatttgtg attgaaaaag agctgcctat ttctttaaat	840

gaattatggt ttgattatcg ttctacctcg ttaaagcaag gttttcgatt agacgttact	900
gcaattcgta aaagtactgc tcaaacttat ttgcaagatt ttcagccatt taaaattaat	960
gtattggatg ttgogtcaaa tgctattttg cgtgcatttc agtatttggt gaatgaacaa	1020
gtgcggtcag aaaatacctt atttttatct caagaagatg actattggtt ggcgatctgt	1080
gaaagatcgc agcaatcgca aattttacaa tctcacgaaa atttgaccgc actttatgaa	1140
caattttaccg aacggtttga aggacaactt gaacaagttt ttgtttatca aattccctca	1200
agtcatacac cattaccga aaactggcag cgagtagaaa cagaactccc ttttattgcg	1260
cttggcaacg cgctatggca aaaagattta catcaacaaa aagtgggtgg ttaaagtgcg	1320
atgaatttat tgccttggcg tacttatcaa catcaaaaagc gtttacgtcg tttagctttt	1380
tatatcgctt tatttatctt gcttgctatt aatttaagt tggttttag caatttgatt	1440
gaacaacaga aacaaaattt gcaagcgcag caaacatctt ttgaacaact taatcagcaa	1500
cttcacaaaa ctaccatgca aattgatcag ttacgcagtg cggtgaaagt tggatgaagt	1560
ttgacatcta ttcccaacga gcaagtaaaa aagagtttac aacagctaag tgaattacct	1620
tttcaacaag gagaactgaa taaatttaaa caagatgccataaacttaag tttggaaggt	1680
aacgcgcaag atcaaacaga atttgaactg attcatcaat ttttaaagaa acattttccc	1740
aatgtgaaat taagtcaggt tcaacctgaa caagatacat tgttttttca ctttgatgtg	1800
gaacaagggg cggaaaaatg aaagcttttt ttaacgatcc ttttactcct tttggaaaat	1860
ggctaagtca gcctttttat gtgcacggtt taaccttttt attgctatta agtgcggtga	1920
tttttcgccc cgtttttagat tatatcgagg ggagttcacg tttccatgaa attgaaaatg	1980
agttagcggg gaaacgttca gaattgttgc atcaacagaa aattttaact tctttacagc	2040
agcagtcgga aagtcgaaaa ctttctccag aactggctgc acaaattatt cctttgaata	2100
aacaaattca acgttttagct gcgcgtaacg gtttatctca gcattttacgt tgggaaatgg	2160
ggcaaaaagcc tattttgcat ttacagctta caggtcattt tgagaaaacg aagacatttt	2220
taaccgcact tttggctaatt tcgtcacagc ttccagtgcg tcgcttgcag tttatcaaac	2280
ccgaagacaa cccattgcaa accgagatca tttttcagct agataaggaa acaaa atg	2338
	Met
	1
aaa cat tgg ttt ttc ctg att ata tta ttt ttt atg aat tgc agt tgg	2386
Lys His Trp Phe Phe Leu Ile Ile Leu Phe Phe Met Asn Cys Ser Trp	
	5 10 15
gga caa gat cct ttc gat aaa aca cag cgt aac cgt tct cag ttt gat	2434
Gly Gln Asp Pro Phe Asp Lys Thr Gln Arg Asn Arg Ser Gln Phe Asp	
	20 25 30

aac gca caa aca gta atg gag cag aca gaa ata att tcc tca gat gta	2482
Asn Ala Gln Thr Val Met Glu Gln Thr Glu Ile Ile Ser Ser Asp Val	
35 40 45	
cct aat aat cta tgc gga gcg gat gaa aat cgc caa gcg gct gaa att	2530
Pro Asn Asn Leu Cys Gly Ala Asp Glu Asn Arg Gln Ala Ala Glu Ile	
50 55 60 65	
cct ttg aac gct tta aaa ttg gtg ggc gta gtg att tct aaa gat aaa	2578
Pro Leu Asn Ala Leu Lys Leu Val Gly Val Val Ile Ser Lys Asp Lys	
70 75 80	
gcc ttt gcc ttg ttg caa gat caa ggt ttg caa att tac agc gtt tta	2626
Ala Phe Ala Leu Leu Gln Asp Gln Gly Leu Gln Ile Tyr Ser Val Leu	
85 90 95	
gag ggc gtt gat gtg gct caa gag ggc tat att gta gaa aaa atc aac	2674
Glu Gly Val Asp Val Ala Gln Glu Gly Tyr Ile Val Glu Lys Ile Asn	
100 105 110	
caa aac aat gtt caa ttt atg cgt aag ctc gga gag caa tgt gat agt	2722
Gln Asn Asn Val Gln Phe Met Arg Lys Leu Gly Glu Gln Cys Asp Ser	
115 120 125	
agt gaa tgg aaa aaa tta agt ttt taa aggaagatta tgaagaaata	2769
Ser Glu Trp Lys Lys Leu Ser Phe	
130 135	
ttttttaaag tgcggttatt ttttagtggtg tttttgtttg ccattaatcg tttttgctaa	2829
tcctaaaaca gataacgaat gtttttttat tcgtttatcg caagcacctt tagctcaaac	2889
actggagcaa ttagcttttc aacaagatgt gaatttagtg atgggtgaga ggtagaagg	2949
caatattttct ttgaaattaa acaatattga tatgccacgt ttgctaaaaa taatcgcaaa	3009
aagtaagcat cttactttga ataaagatga tggggtttat tatttaaacg gcagtcattc	3069
tggcaaaggc caagttgcag gaaatcttac gacaaatgaa ccgcacttag tcagccacac	3129
ggtaaaaactt cattttgcta aagcctctga attaatgaaa tccttaacaa caggaagtgg	3189
atctttgctt tcttctgcgg ggagcattac ctttgatgat cgcagtaatt tgctggttat	3249
tcaggatgaa cctcgttttg tgcaaaatat caaaaaactg attgctgaaa tggataagcc	3309
tattgaacag atcgctattg aagcgogaat tgtgacaatt acggatgaga gtttgaaaga	3369
acttggcggtt cgggtgggga tttttaatcc aactgaaaat gcaagacgag ttgcgggcag	3429
ccttacaggc aatagctttg aaaatattgc ggataatcct aatgtaaatt ttgcgacaac	3489
gacgacacct gctggctcta tagcattaca agtcgcgaaa attaatgggc gattgcttga	3549
tttagaattg agtgcgttgg agcgtgaaaa taatgtagaa attattgcaa gtctctgctt	3609
actcactacc aataagaaaa gtgcgagcat taaacagggg acagaaattc cttacatcgt	3669
gagtaatact cgtaacgata cgcaatctgt ggaatttcgt gaggcagtac ttggtttgga	3729
agtgcgcca catatttcta aagataacaa tatcttactt gatttatttg taagtcaaaa	3789
ttcccctggc tctcgtgtcg cttatggaca aatgaggtg gtttctattg ataagcaaga	3849

```

aattaatact cagggtttttg ccaaagatgg ggaaaccatt gtgcttggcg gcgtatttca 3909
cgacacaatc acgaaaagcg aagataaagt gccattgctt ggcgatatac ccgttattaa 3969
acgattattht agcaaagaaa gtgaacgaca tcaaaaacgt gagctcgtga ttttcgctcac 4029
gccgcatatt ttaaaagcag gagaaacgtt agaggcgttg aaacaaaaaa gtgcgggggaa 4089
aaaataactt ttttagacga tgaatttttt taattttcgc tgtatccact gtcgtggcaa 4149
tcttcatatt gcaaaaaatg ggctatgttc aggttgccaa aaacaaatta aatcttttcc 4209
ttattgcggt catttgtgtg cggaattgca atattatgcg cagcattgtg gtaattgtct 4269
taaacaagaa ccaagttggg ataagatggg cattattggg cattatattg aacctctttc 4329
gatattgatt caccgtttta aatttcaaaa tcaatttttg attgaccgca ctttagctcg 4389
gcttttatat cttgcggtgc gtgatgctaa acgaacgcat caacttaaat tgccagaagc 4449
aatcattcca gtgcctttat atcatttttcg tcagtggcga cgggggttata atcaggcaga 4509
tttattatct cggcaattaa gtcgctggct ggatattcct aatttgagca atatcgtaaa 4569
gcgtgtgaaa cacacctata ctcaacgtgg tttgagtga aaagatcgtc gtcagaattt 4629
aaaaaatgcc ttttctcttg ttgtttcgaa aaatgaattt ccttatcgcc gtgttgcggt 4689
gggtggatgat gtgattacta ctggttctac actcaatgaa atctcaaaat tgttgcgaaa 4749
attaggtgtg gaggagattc aagtgtgggg gctggcacga gcttaatata aagcactgga 4809
aaaaaaagcg cgataagcgt attattcccg atactttctc tcaagtattt aggac 4864

```

<210> 16

<211> 137

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 16

```

Met Lys His Trp Phe Phe Leu Ile Ile Leu Phe Phe Met Asn Cys Ser
1           5           10           15

```

```

Trp Gly Gln Asp Pro Phe Asp Lys Thr Gln Arg Asn Arg Ser Gln Phe
          20           25           30

```

```

Asp Asn Ala Gln Thr Val Met Glu Gln Thr Glu Ile Ile Ser Ser Asp
          35           40           45

```

Val Pro Asn Asn Leu Cys Gly Ala Asp Glu Asn Arg Gln Ala Ala Glu
50 55 60

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

Lys Ala Phe Ala Leu Leu Gln Asp Gln Gly Leu Gln Ile Tyr Ser Val
85 90 95

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

Asn Gln Asn Asn Val Gln Phe Met Arg Lys Leu Gly Glu Gln Cys Asp
115 120 125

Ser Ser Glu Trp Lys Lys Leu Ser Phe
130 135

<210> 17

<211> 4864

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (2759)..(4096)

<400> 17

tacgaataat gggttttttct ggggttaaga aaaagttacg cgctaattgt tgagtaatcg	60
tacttgcacc ttgtgatgca cgcgcattac tctctgcgac aaacaatgca cgagcaatgc	120
cgataggggtc taatccgtga tgatcgtaaa aacgattgtc ttccgttgct aaaaatgcgt	180
caattaagcg ttgtggcaca tcggctaatt tctctggaat acggcggttc tcgcccactt	240
cgccaattaa tttaccgtca gccgtataaa tctgcattgg ttgttgtaat tcaacgggtc	300
ttaatgtttc tactgagggc aattccgatt ttaggtggaa atacaacatt cgcgcagcca	360

ctaaacctaa aatacataaa gttaataggg tgtttaatat taattttgcg atccgcatcg	420
taaaattctc gcttggttaa tgaatattct tgtcaagaga cctatgattt agttgttaag	480
tataaaagat tcagccttta aagaatagga aagaatatgc aattctccct gaaaaattac	540
cgcactttac aaatcggcat tcatcgtaag cagggttatt ttgattttgt gtggtttgat	600
gatcttgaac agccacaaag ttatcaaatt tttgttaatg atcgtgattt taaaaatcgt	660
tttttacaac agctaaaaac acaatatcaa gggaaaacct ttcttttaca gtttgtggca	720
agcattcccc ctcacttaac ttgggtcgaaa gtattaatgt tgccacaagt gttaaatgcg	780
caagaatgtc atcaacaatg taaatttgtg attgaaaaag agctgcctat ttctttaaat	840
gaattatggg ttgattatcg ttctacctcg ttaaagcaag gttttcgatt agacgttact	900
gcaattcgta aaagtactgc tcaaacttat ttgcaagatt ttcagccatt taaaattaat	960
gtattggatg ttgctgcaaa tgctattttg cgtgcatttc agtatttgtt gaatgaacaa	1020
gtgcggtcag aaaatacctt atttttatct caagaagatg actattgttt ggcgatctgt	1080
gaaagatcgc agcaatcgca aattttacaa tctcacgaaa atttgaccgc actttatgaa	1140
caatttaccg aacgttttga aggacaactt gaacaagtgt ttgtttatca aattccctca	1200
agtcatacac cattaccgga aaactggcag cgagtagaaa cagaactccc ttttattgcg	1260
cttggcaacg cgctatggca aaaagattta catcaacaaa aagtgggtgg ttaaagtgcg	1320
atgaatttat tgcttggcg tacttatcaa catcaaaagc gtttacgtcg tttagctttt	1380
tatatcgctt tatttatctt gcttgctatt aatttaatgt tggcttttag caatttgatt	1440
gaacaacaga aacaaaattt gcaagcgtag caaacatctt ttgaacaact taatcagcaa	1500
cttcacaaaa ctaccatgca aattgatcag ttacgcagtg cggtgaaagt tggatgaagt	1560
ttgacatcta ttccaacga gcaagtaaaa aagagtttac aacagctaag tgaattacct	1620
tttcaacaag gagaactgaa taaattttaa caagatgcca ataacttaag tttggaaggt	1680
aacgcgcaag atcaaacaga atttgaactg attcatcaat ttttaagaa acattttccc	1740
aatgtgaaat taagtcaggt tcaacctgaa caagatacat tgttttttca ctttgatgtg	1800
gaacaagggg cggaaaaatg aaagcttttt ttaacgatcc ttttactcct tttggaaaat	1860
ggctaagtca gcctttttat gtgcacgggt taaccttttt attgctatta agtgcgggtg	1920
tttttcgccc cgtttttagat tatatcgagg ggagttcacg ttcccatgaa attgaaaatg	1980
agttagcggg gaaacgttca gaattgttgc atcaacagaa aatttttaact tctttacagc	2040
agcagtcgga aagtcgaaaa ctttctccag aactggctgc acaaattatt cctttgaata	2100
aacaaattca acgttttagct gcgcgtaacg gtttatctca gcatttacgt tgggaaatgg	2160

ggcaaaagcc tattttgcat ttacagctta cagggtcattt tgagaaaacg aagacatttt	2220
taaccgcact tttggctaatt tcgtcacagc tttcagtgag tcgcttgacag tttatcaaac	2280
ccgaagacaa cccattgcaa accgagatca tttttcagct agataaggaa acaaaatgaa	2340
acattggttt ttcttgatta tattattttt tatgaattgc agttggggac aagatccttt	2400
cgataaaaca cagcgtaacc gttctcagtt tgataacgca caaacagtaa tggagcagac	2460
agaaataatt tcctcagatg tacctaataa tctatgcgga gcggatgaaa atcgccaagc	2520
ggctgaaatt cctttgaacg ctttaaaatt ggtgggcgta gtgatttcta aagataaagc	2580
cctttgccttg ttgcaagatc aaggtttgca aatttacagc gtttttagagg gcgttgatgt	2640
ggctcaagag ggctatattg tagaaaaaat caacccaaac aatgttcaat ttatgcgtaa	2700
gctcggagag caatgtgata gtagtgaatg gaaaaaatta agtttttaaa ggaagatt	2758
atg aag aaa tat ttt tta aag tgc ggt tat ttt tta gtg tgt ttt tgt	2806
Met Lys Lys Tyr Phe Leu Lys Cys Gly Tyr Phe Leu Val Cys Phe Cys	
1 5 10 15	
ttg cca tta atc gtt ttt gct aat cct aaa aca gat aac gaa tgt ttt	2854
Leu Pro Leu Ile Val Phe Ala Asn Pro Lys Thr Asp Asn Glu Cys Phe	
20 25 30	
ttt att cgt tta tcg caa gca cct tta gct caa aca ctg gag caa tta	2902
Phe Ile Arg Leu Ser Gln Ala Pro Leu Ala Gln Thr Leu Glu Gln Leu	
35 40 45	
gct ttt caa caa gat gtg aat tta gtg atg ggt gag agg tta gaa ggc	2950
Ala Phe Gln Gln Asp Val Asn Leu Val Met Gly Glu Arg Leu Glu Gly	
50 55 60	
aat att tct ttg aaa tta aac aat att gat atg cca cgt ttg cta aaa	2998
Asn Ile Ser Leu Lys Leu Asn Asn Ile Asp Met Pro Arg Leu Leu Lys	
65 70 75 80	
ata atc gca aaa agt aag cat ctt act ttg aat aaa gat gat ggg gtt	3046
Ile Ile Ala Lys Ser Lys His Leu Thr Leu Asn Lys Asp Asp Gly Val	
85 90 95	
tat tat tta aac ggc agt caa tct ggc aaa ggt caa gtt gca gga aat	3094
Tyr Tyr Leu Asn Gly Ser Gln Ser Gly Lys Gly Gln Val Ala Gly Asn	
100 105 110	
ctt acg aca aat gaa ccg cac tta gtc agc cac acg gta aaa ctt cat	3142
Leu Thr Thr Asn Glu Pro His Leu Val Ser His Thr Val Lys Leu His	
115 120 125	
ttt gct aaa gcc tct gaa tta atg aaa tcc tta aca aca gga agt gga	3190
Phe Ala Lys Ala Ser Glu Leu Met Lys Ser Leu Thr Thr Gly Ser Gly	
130 135 140	
tct ttg ctt tct tct gcg ggg agc att acc ttt gat gat cgc agt aat	3238
Ser Leu Leu Ser Ser Ala Gly Ser Ile Thr Phe Asp Asp Arg Ser Asn	
145 150 155 160	

ttg ctg gtt att cag gat gaa cct cgt ttt gtg caa aat atc aaa aaa	3286
Leu Leu Val Ile Gln Asp Glu Pro Arg Phe Val Gln Asn Ile Lys Lys	
165 170 175	
ctg att gct gaa atg gat aag cct att gaa cag atc gct att gaa gcg	3334
Leu Ile Ala Glu Met Asp Lys Pro Ile Glu Gln Ile Ala Ile Glu Ala	
180 185 190	
cga att gtg aca att acg gat gag agt ttg aaa gaa ctt ggc gtt cgg	3382
Arg Ile Val Thr Ile Thr Asp Glu Ser Leu Lys Glu Leu Gly Val Arg	
195 200 205	
tgg ggg att ttt aat cca act gaa aat gca aga cga gtt gcg ggc agc	3430
Trp Gly Ile Phe Asn Pro Thr Glu Asn Ala Arg Val Ala Gly Ser	
210 215 220	
ctt aca ggc aat agc ttt gaa aat att gcg gat aat ctt aat gta aat	3478
Leu Thr Gly Asn Ser Phe Glu Asn Ile Ala Asp Asn Leu Asn Val Asn	
225 230 235 240	
ttt gcg aca acg acg aca cct gct ggc tct ata gca tta caa gtc gcg	3526
Phe Ala Thr Thr Thr Thr Pro Ala Gly Ser Ile Ala Leu Gln Val Ala	
245 250 255	
aaa att aat ggg cga ttg ctt gat tta gaa ttg agt gcg ttg gag cgt	3574
Lys Ile Asn Gly Arg Leu Leu Asp Leu Glu Leu Ser Ala Leu Glu Arg	
260 265 270	
gaa aat aat gta gaa att att gca agt cct cgc tta ctc act acc aat	3622
Glu Asn Asn Val Glu Ile Ile Ala Ser Pro Arg Leu Leu Thr Thr Asn	
275 280 285	
aag aaa agt gcg agc att aaa cag ggg aca gaa att cct tac atc gtg	3670
Lys Lys Ser Ala Ser Ile Lys Gln Gly Thr Glu Ile Pro Tyr Ile Val	
290 295 300	
agt aat act cgt aac gat acg caa tct gtg gaa ttt cgt gag gca gta	3718
Ser Asn Thr Arg Asn Asp Thr Gln Ser Val Glu Phe Arg Glu Ala Val	
305 310 315 320	
ctt ggt ttg gaa gtg acg cca cat att tct aaa gat aac aat atc tta	3766
Leu Gly Leu Glu Val Thr Pro His Ile Ser Lys Asp Asn Asn Ile Leu	
325 330 335	
ctt gat tta ttg gta agt caa aat tcc cct ggt tct cgt gtc gct tat	3814
Leu Asp Leu Leu Val Ser Gln Asn Ser Pro Gly Ser Arg Val Ala Tyr	
340 345 350	
gga caa aat gag gtg gtt tct att gat aag caa gaa att aat act cag	3862
Gly Gln Asn Glu Val Val Ser Ile Asp Lys Gln Glu Ile Asn Thr Gln	
355 360 365	
gtt ttt gcc aaa gat ggg gaa acc att gtg ctt ggc ggc gta ttt cac	3910
Val Phe Ala Lys Asp Gly Glu Thr Ile Val Leu Gly Gly Val Phe His	
370 375 380	
gac aca atc acg aaa agc gaa gat aaa gtg cca ttg ctt ggc gat ata	3958
Asp Thr Ile Thr Lys Ser Glu Asp Lys Val Pro Leu Leu Gly Asp Ile	
385 390 395 400	
ccc gtt att aaa cga tta ttt agc aaa gaa agt gaa cga cat caa aaa	4006
Pro Val Ile Lys Arg Leu Phe Ser Lys Glu Ser Glu Arg His Gln Lys	
405 410 415	

cgt gag ctc gtg att ttc gtc acg ccg cat att tta aaa gca gga gaa 4054
 Arg Glu Leu Val Ile Phe Val Thr Pro His Ile Leu Lys Ala Gly Glu
 420 425 430
 acg tta gag gcg ttg aaa caa aaa agt gcg ggg aaa aaa taa 4096
 Thr Leu Glu Ala Leu Lys Gln Lys Ser Ala Gly Lys Lys
 435 440 445
 cttttttaga cgatgaattt ttttaatttt cgctgtatcc actgtcgtgg caatcttcat 4156
 attgcaaaaa atgggctatg ttcagggttg caaaaacaaa ttaaattctt tccttattgc 4216
 ggtcattgtg gtgcggaatt gcaatattat gcgcagcatt gtggaattg tcttaaacaa 4276
 gaaccaagtt gggataagat ggtcattatt gggcattata ttgaacctct ttcgatattg 4336
 attcaccgtt ttaaatttca aaatcaattt tggattgacc gcacttttagc tcggctttta 4396
 tatcttgccg tgctgatgc taaacgaacg catcaactta aattgccaga agcaatcatt 4456
 ccagtgcctt tatatcattt tcgtcagtgg cgacgggggtt ataatcagge agatttatta 4516
 tctcggaat taagtcgtg gctggatatt cctaatttga gcaatatcgt aaagcgtgtg 4576
 aaacacacct atactcaacg tggtttgagt gcaaaagatc gtcgtcagaa tttaaaaaat 4636
 gccttttctc ttgttgttc gaaaaatgaa tttccttacc gccgtgttg gttggtggat 4696
 gatgtgatta ctactggtc tacactcaat gaaatctcaa aattgttgcg aaaattaggt 4756
 gtggaggaga ttcaagtgtg ggggctggca cgagcttaat ataaagcact ggaaaaaaaa 4816
 gcgcgataag cgtattattc ccgatacttt ctctcaagta tttaggac 4864

<210> 18

<211> 445

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 18

Met Lys Lys Tyr Phe Leu Lys Cys Gly Tyr Phe Leu Val Cys Phe Cys
 1 5 10 15

Leu Pro Leu Ile Val Phe Ala Asn Pro Lys Thr Asp Asn Glu Cys Phe
 20 25 30

Phe Ile Arg Leu Ser Gln Ala Pro Leu Ala Gln Thr Leu Glu Gln Leu
 35 40 45

Ala Phe Gln Gln Asp Val Asn Leu Val Met Gly Glu Arg Leu Glu Gly
 50 55 60

Asn Ile Ser Leu Lys Leu Asn Asn Ile Asp Met Pro Arg Leu Leu Lys
 65 70 75 80

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

Tyr Tyr Leu Asn Gly Ser Gln Ser Gly Lys Gly Gln Val Ala Gly Asn
 100 105 110

Leu Thr Thr Asn Glu Pro His Leu Val Ser His Thr Val Lys Leu His
 115 120 125

Phe Ala Lys Ala Ser Glu Leu Met Lys Ser Leu Thr Thr Gly Ser Gly
 130 135 140

Ser Leu Leu Ser Ser Ala Gly Ser Ile Thr Phe Asp Asp Arg Ser Asn
 145 150 155 160

Leu Leu Val Ile Gln Asp Glu Pro Arg Phe Val Gln Asn Ile Lys Lys
 165 170 175

Leu Ile Ala Glu Met Asp Lys Pro Ile Glu Gln Ile Ala Ile Glu Ala
 180 185 190

Arg Ile Val Thr Ile Thr Asp Glu Ser Leu Lys Glu Leu Gly Val Arg
 195 200 205

Trp Gly Ile Phe Asn Pro Thr Glu Asn Ala Arg Arg Val Ala Gly Ser
 210 215 220

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

Phe Ala Thr Thr Thr Thr Pro Ala Gly Ser Ile Ala Leu Gln Val Ala
 245 250 255

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

Glu Asn Asn Val Glu Ile Ile Ala Ser Pro Arg Leu Leu Thr Thr Asn
275 280 285

Lys Lys Ser Ala Ser Ile Lys Gln Gly Thr Glu Ile Pro Tyr Ile Val
290 295 300

Ser Asn Thr Arg Asn Asp Thr Gln Ser Val Glu Phe Arg Glu Ala Val
305 310 315 320

Leu Gly Leu Glu Val Thr Pro His Ile Ser Lys Asp Asn Asn Ile Leu
325 330 335

Leu Asp Leu Leu Val Ser Gln Asn Ser Pro Gly Ser Arg Val Ala Tyr
340 345 350

Gly Gln Asn Glu Val Val Ser Ile Asp Lys Gln Glu Ile Asn Thr Gln
355 360 365

Val Phe Ala Lys Asp Gly Glu Thr Ile Val Leu Gly Gly Val Phe His
370 375 380

Asp Thr Ile Thr Lys Ser Glu Asp Lys Val Pro Leu Leu Gly Asp Ile
385 390 395 400

Pro Val Ile Lys Arg Leu Phe Ser Lys Glu Ser Glu Arg His Gln Lys
405 410 415

Arg Glu Leu Val Ile Phe Val Thr Pro His Ile Leu Lys Ala Gly Glu
420 425 430

Thr Leu Glu Ala Leu Lys Gln Lys Ser Ala Gly Lys Lys
435 440 445

<210> 19

<211> 4864

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (4109)..(4795)

<400> 19

```
tacgaataat gggtttttct ggggttaaga aaaagttacg cgctaattgt tgagtaatcg      60
tacttgcacc ttgtgatgca ccgccattac tcaactgcac aaacaatgca cgagcaatgc      120
cgataggggtc taatccgtga tgatcgtaaa aacgattgtc ttccgttgct aaaaatgcgt      180
caattaagcg ttgtggcaca tcggctaatt tcaactggaat acggcggtgc tcgccactt      240
cgccaattaa ttaccgtca gccgtataaa tctgcattgg ttgttgtaat tcaacggttc      300
ttaatgtttc tactgagggc aattccgatt ttaggtggaa atacaacatt ccgccagcca      360
ctaaacctaa aatacataaa gttaataggg tgtttaatat taattttgcg atccgcacg      420
taaaattctc gcttgggtta tgaatattct tgtcaagaga cctatgattt agttgttaag      480
tataaaagat tcagccttta aagaatagga aagaatatgc aattctccct gaaaaattac      540
cgcactttac aaatcggcat tcacgtaag caggggtatt ttgattttgt gtggtttgat      600
gatcttgaac agccacaaag ttatcaaatt tttgttaatg atcgtgattt taaaaatcgt      660
tttttacaac agctaaaaac acaatatcaa gggaaaacct ttcctttaca gtttgtggca      720
agcattcccg ctcaactaac ttggtcgaaa gtattaatgt tgccacaagt gttaaatgcg      780
caagaatgtc atcaacaatg taaatttgtg attgaaaaag agctgcctat ttctttaaat      840
gaattatggg ttgattatcg ttctacctcg ttaaagcaag gttttcgatt agacgttact      900
gcaattcgta aaagtactgc tcaaaactta ttgcaagatt ttcagccatt taaaattaat      960
gtattggatg ttgcgtcaaa tgctattttg cgtgcatttc agtatttgtt gaatgaacaa     1020
gtgcggtcag aaaatacctt atttttattt caagaagatg actattgttt ggcgatctgt     1080
gaaagatcgc agcaatcgca aattttacaa tctcacgaaa atttgaccgc actttatgaa     1140
caatttaccc aacgttttga aggacaactt gaacaagttt ttgtttatca aattccctca     1200
agtcatacac cattaccgca aaactggcag cgagtagaaa cagaactccc ttttattgcg     1260
cttggaacag cgctatggca aaaagattta catcaacaaa aagtgggtgg ttaaagtgcg     1320
atgaatttat tgccctggcg tacttatcaa catcaaaagc gtttacgtcg tttagctttt     1380
tatatcgctt tatttatctt gcttgctatt aatttaatgt tggcttttag caatttgatt     1440
gaacaacaga aacaaaattt gcaagcgag caaacatctt ttgaacaact taatcagcaa     1500
```

cttcacaaaa	ctaccatgca	aattgatcag	ttacgcagtg	cggtgaaagt	tgggtgaagtt	1560
ttgacatcta	ttcccaacga	gcaagtaaaa	aagagtttac	aacagctaag	tgaattacct	1620
tttcaacaag	gagaactgaa	taaattttaa	caagatgcc	ataacttaag	tttggaaggt	1680
aacgcgcaag	atcaaacaga	atgtgaactg	attcatcaat	ttttaaagaa	acattttccc	1740
aatgtgaaat	taagtcaggt	tcaacctgaa	caagatacat	tgttttttca	ctttgatgtg	1800
gaacaagggg	cggaaaaatg	aaagcttttt	ttaacgatcc	ttttactcct	tttggaat	1860
ggctaagtca	gcctttttat	gtgcacgggt	taaccttttt	attgctatta	agtgcgggtga	1920
tttttcgccc	cgtttttagat	tatatcgagg	ggagttcacg	tttccatgaa	attgaaaatg	1980
agttagcggg	gaaacgttca	gaattgttgc	atcaacagaa	aattttaact	tctttacagc	2040
agcagtcgga	aagtcgaaaa	ctttctccag	aactggctgc	acaaattatt	cctttgaata	2100
aacaaattca	acgttttagct	gcgcgtaacg	gtttatctca	gcatttacgt	tgggaaatgg	2160
ggcaaaagcc	tattttgcat	ttacagctta	caggtcattt	tgagaaaacg	aagacatttt	2220
taaccgcact	tttggcta	tcgtcacagc	tttcagtgag	tcgcttgag	tttatcaaac	2280
ccgaagacaa	cccattgcaa	accgagatca	tttttcagct	agataaggaa	acaaaatgaa	2340
acattgggtt	ttcctgatta	tattattttt	tatgaattgc	agttggggac	aagatccttt	2400
cgataaaaca	cagcgttaacc	gttctcagtt	tgataacgca	caaacagtaa	tggagcagac	2460
agaaataatt	tcctcagatg	tacctaataa	tctatgcgga	gcggatgaaa	atcgccaagc	2520
ggctgaaatt	cctttgaacg	ctttaaaatt	gggtggcgta	gtgatttcta	aagataaagc	2580
ctttgccttg	ttgcaagatc	aaggtttgca	aattttacagc	gttttagagg	gcgttgatgt	2640
ggctcaagag	ggctatattg	tagaaaaaat	caacccaaac	aatgttcaat	ttatgcgtaa	2700
gctcggagag	caatgtgata	gtagtgaatg	gaaaaaatta	agttttttaa	ggaagattat	2760
gaagaaatat	tttttaaagt	gcggttattt	tttagtgtgt	ttttgtttgc	cattaatcgt	2820
ttttgcta	ctaaaacag	ataacgaatg	tttttttatt	cgtttatcgc	aagcaccttt	2880
agctcaaaaca	ctggagcaat	tagcttttca	acaagatgtg	aatttagtga	tgggtgagag	2940
gttagaaggc	aatatttctt	tgaaattaaa	caatattgat	atgccacgtt	tgctaaaaat	3000
aatcgcaaaa	agtaagcatc	ttactttgaa	taaagatgat	ggggtttatt	atttaaacgg	3060
cagtcaatct	ggcaaaggtc	aagttgcagg	aaatcttacg	acaaatgaac	cgcacttagt	3120
cagccacacg	gtaaaacttc	attttgctaa	agcctctgaa	ttaatgaaat	ccttaacaac	3180
aggaagtggg	tctttgcttt	cttctgcggg	gagcattacc	tttgatgatc	gcagtaattt	3240
gctgggttatt	caggatgaac	ctcgttttgt	gcaaaatata	aaaaaactga	ttgctgaaat	3300
ggataagcct	attgaacaga	tcgctattga	agcgcggaatt	gtgacaatta	cggatgagag	3360
tttgaaagaa	cttggcggtc	ggtgggggat	ttttaatcca	actgaaaatg	caagacgagt	3420

tgcgggcagc cttacaggca atagctttga aaatattgcg gataatctta atgtaaattt	3480
tgcgacaacg acgacacctg ctggctctat agcattacaa gtcgcgaaaa ttaatgggcg	3540
attgcttgat ttagaattga gtgcggttga gcgtagaaat aatgtagaaa ttattgcaag	3600
tcctcgctta ctcaactacca ataagaaaag tgcgagcatt aaacagggga cagaaattcc	3660
ttacatcgtg agtaatactc gtaacgatac gcaatctgtg gaatttcgtg aggcaagtact	3720
tggtttggaa gtgacgccac atattttctaa agataacaat atcttacttg atttattggt	3780
aagtcaaaat tcccctgggt ctctgtctcg ttatggacaa aatgaggtgg tttctattga	3840
taagcaagaa attaatactc aggtttttgc caaagatggg gaaaccattg tgcttggcgg	3900
cgtatttcac gacacaatca cgaaaagcga agataaagtg ccattgcttg gcgatatacc	3960
cgttattaaa cgattattta gcaaagaaag tgaacgacat caaaaacgtg agctcgtgat	4020
tttcgtcacg ccgcataattt taaaagcagg agaaacgtta gaggcgttga aacaaaaaag	4080
tgcggggaaa aaataacttt tttagacg atg aat ttt ttt aat ttt cgc tgt	4132
Met Asn Phe Phe Asn Phe Arg Cys	
1 5	
atc cac tgt cgt ggc aat ctt cat att gca aaa aat ggg cta tgt tca	4180
Ile His Cys Arg Gly Asn Leu His Ile Ala Lys Asn Gly Leu Cys Ser	
10 15 20	
ggg tgc caa aaa caa att aaa tct ttt cct tat tgc ggt cat tgt ggt	4228
Gly Cys Gln Lys Gln Ile Lys Ser Phe Pro Tyr Cys Gly His Cys Gly	
25 30 35 40	
gcg gaa ttg caa tat tat gcg cag cat tgt ggt aat tgt ctt aaa caa	4276
Ala Glu Leu Gln Tyr Tyr Ala Gln His Cys Gly Asn Cys Leu Lys Gln	
45 50 55	
gaa cca agt tgg gat aag atg gtc att att ggg cat tat att gaa cct	4324
Glu Pro Ser Trp Asp Lys Met Val Ile Ile Gly His Tyr Ile Glu Pro	
60 65 70	
ctt tgc ata ttg att cac cgt ttt aaa ttt caa aat caa ttt tgg att	4372
Leu Ser Ile Leu Ile His Arg Phe Lys Phe Gln Asn Gln Phe Trp Ile	
75 80 85	
gac cgc act tta gct cgg ctt tta tat ctt gcg gtg cgt gat gct aaa	4420
Asp Arg Thr Leu Ala Arg Leu Leu Tyr Leu Ala Val Arg Asp Ala Lys	
90 95 100	
cga acg cat caa ctt aaa ttg cca gaa gca atc att cca gtg cct tta	4468
Arg Thr His Gln Leu Lys Leu Pro Glu Ala Ile Ile Pro Val Pro Leu	
105 110 115 120	
tat cat ttt cgt cag tgg cga cgg ggt tat aat cag gca gat tta tta	4516
Tyr His Phe Arg Gln Trp Arg Arg Gly Tyr Asn Gln Ala Asp Leu Leu	
125 130 135	
tct cgg caa tta agt cgc tgg ctg gat att cct aat ttg agc aat atc	4564
Ser Arg Gln Leu Ser Arg Trp Leu Asp Ile Pro Asn Leu Ser Asn Ile	
140 145 150	

gta aag cgt gtg aaa cac acc tat act caa cgt ggt ttg agt gca aaa	4612
Val Lys Arg Val Lys His Thr Tyr Thr Gln Arg Gly Leu Ser Ala Lys	
155 160 165	
gat cgt cgt cag aat tta aaa aat gcc ttt tct ctt gtt gtt tcg aaa	4660
Asp Arg Arg Gln Asn Leu Lys Asn Ala Phe Ser Leu Val Val Ser Lys	
170 175 180	
aat gaa ttt cct tat cgc cgt gtt gcg ttg gtg gat gat gtg att act	4708
Asn Glu Phe Pro Tyr Arg Arg Val Ala Leu Val Asp Asp Val Ile Thr	
185 190 195 200	
act ggt tct aca ctc aat gaa atc tca aaa ttg ttg cga aaa tta ggt	4756
Thr Gly Ser Thr Leu Asn Glu Ile Ser Lys Leu Leu Arg Lys Leu Gly	
205 210 215	
gtg gag gag att caa gtg tgg ggg ctg gca cga gct taa tataaagcac	4805
Val Glu Glu Ile Gln Val Trp Gly Leu Ala Arg Ala	
220 225	
tggaaaaaaa agcgcgataa gcgtattatt cccgatactt tctctcaagt atttaggc	4864

<210> 20

<211> 228

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 20

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

Lys Phe Gln Asn Gln Phe Trp Ile Asp Arg Thr Leu Ala Arg Leu Leu
85 90 95

Tyr Leu Ala Val Arg Asp Ala Lys Arg Thr His Gln Leu Lys Leu Pro
100 105 110

Glu Ala Ile Ile Pro Val Pro Leu Tyr His Phe Arg Gln Trp Arg Arg
115 120 125

Gly Tyr Asn Gln Ala Asp Leu Leu Ser Arg Gln Leu Ser Arg Trp Leu
130 135 140

Asp Ile Pro Asn Leu Ser Asn Ile Val Lys Arg Val Lys His Thr Tyr
145 150 155 160

Thr Gln Arg Gly Leu Ser Ala Lys Asp Arg Arg Gln Asn Leu Lys Asn
165 170 175

Ala Phe Ser Leu Val Val Ser Lys Asn Glu Phe Pro Tyr Arg Arg Val
180 185 190

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

Ser Lys Leu Leu Arg Lys Leu Gly Val Glu Glu Ile Gln Val Trp Gly
210 215 220

Leu Ala Arg Ala
225

<210> 21

<211> 677

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (73)..(612)

<400> 21

```
tcacatgccc tatgttttca tacaaattaa agcatattaa atatttcgac tgcccctgtt      60
aaaaggagaa aa atg caa aca ata agt aaa caa cta agt gcg gtt att ttc      111
          Met Gln Thr Ile Ser Lys Gln Leu Ser Ala Val Ile Phe
              1              5              10

cct ttc att ttt tct gcc tgc gtt tca caa tct gcg tct agc tta gat      159
Pro Phe Ile Phe Ser Ala Cys Val Ser Gln Ser Ala Ser Ser Leu Asp
      15              20              25

cat caa gct gcc gcc aaa gcg cga gtg gaa ctc gct ttg agc tat ctt      207
His Gln Ala Ala Ala Lys Ala Arg Val Glu Leu Ala Leu Ser Tyr Leu
      30              35              40              45

cag caa aat aat cct caa ctg gct aaa atc aat tta gac aaa gca ctt      255
Gln Gln Asn Asn Pro Gln Leu Ala Lys Ile Asn Leu Asp Lys Ala Leu
              50              55              60

caa cac gat aaa aat tac tat ctc gta cat tca gca ctt gca cat tat      303
Gln His Asp Lys Asn Tyr Tyr Leu Val His Ser Ala Leu Ala His Tyr
              65              70              75

tat caa caa caa ggg caa ata gaa aat gcc ttt cgt gag tat gaa ata      351
Tyr Gln Gln Gln Gly Gln Ile Glu Asn Ala Phe Arg Glu Tyr Glu Ile
              80              85              90

gcc gta aaa ctt aat cat aaa caa ggc gat gta cat aat aat ttt ggt      399
Ala Val Lys Leu Asn His Lys Gln Gly Asp Val His Asn Asn Phe Gly
              95              100              105

acg ttt cta tgt agt caa aag aaa ttt gag caa gcc cag caa caa ttt      447
Thr Phe Leu Cys Ser Gln Lys Lys Phe Glu Gln Ala Gln Gln Gln Phe
      110              115              120              125

gaa tta gcc ctt aat tcg ccg aat tat tat cat caa gca gat aca ttt      495
Glu Leu Ala Leu Asn Ser Pro Asn Tyr Tyr His Gln Ala Asp Thr Phe
              130              135              140

gaa aat atc gcg ctt tgt gct tat tcc gcg aaa aaa atg gat att tat      543
Glu Asn Ile Ala Leu Cys Ala Tyr Ser Ala Lys Lys Met Asp Ile Tyr
              145              150              155

cag caa aca tta gaa aaa tta cgt caa atc aat gga aaa cgt gcg gaa      591
Gln Gln Thr Leu Glu Lys Leu Arg Gln Ile Asn Gly Lys Arg Ala Glu
              160              165              170

aaa ttc aat agt cta aaa taa agcattgccca aatcaagtat tggactttaa      642
Lys Phe Asn Ser Leu Lys
      175

aatttagccc ttatttacgg cctaattatt tgatt      677
```

<210> 22

<211> 179

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 22

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

Phe Ser Ala Cys Val Ser Gln Ser Ala Ser Ser Leu Asp His Gln Ala
20 25 30

Ala Ala Lys Ala Arg Val Glu Leu Ala Leu Ser Tyr Leu Gln Gln Asn
35 40 45

Asn Pro Gln Leu Ala Lys Ile Asn Leu Asp Lys Ala Leu Gln His Asp
50 55 60

Lys Asn Tyr Tyr Leu Val His Ser Ala Leu Ala His Tyr Tyr Gln Gln
65 70 75 80

Gln Gly Gln Ile Glu Asn Ala Phe Arg Glu Tyr Glu Ile Ala Val Lys
85 90 95

Leu Asn His Lys Gln Gly Asp Val His Asn Asn Phe Gly Thr Phe Leu
100 105 110

Cys Ser Gln Lys Lys Phe Glu Gln Ala Gln Gln Gln Phe Glu Leu Ala
115 120 125

Leu Asn Ser Pro Asn Tyr Tyr His Gln Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile
130 135 140

Ala Leu Cys Ala Tyr Ser Ala Lys Lys Met Asp Ile Tyr Gln Gln Thr
145 150 155 160

Leu Glu Lys Leu Arg Gln Ile Asn Gly Lys Arg Ala Glu Lys Phe Asn
165 170 175

Ser Leu Lys

<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 23
tgtgacactt ccgcaaaaa 19

<210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 24
taataaaagg aaaatgaatg a 21

<210> 25
<211> 447
<212> ADN
<213> *H. influenzae*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(447)

<400> 25

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata	48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile	
1 5 10 15	
gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca	96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala	
20 25 30	
att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta	144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu	
35 40 45	
ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat	192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr	
50 55 60	
agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca	240
Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala	
65 70 75 80	
gca gat ata acc aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc	288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser	
85 90 95	
aac ggt gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa	336
Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu	
100 105 110	
tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca	384
Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr	
115 120 125	
aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc	432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys	
130 135 140	
gga agt gtc aca caa	447
Gly Ser Val Thr Gln	
145	

<210> 26

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 26

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

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

<210> 27

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 27

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata	48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile	
1 5 10 15	
gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca	96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala	
20 25 30	
att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta	144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu	
35 40 45	
ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat	192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr	
50 55 60	
agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca	240
Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala	
65 70 75 80	
gca gat ata acc aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc	288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser	
85 90 95	
aac ggt gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa	336
Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu	
100 105 110	
tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca	384
Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr	
115 120 125	
aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc	432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys	
130 135 140	
gga agt gtc aca caa	447
Gly Ser Val Thr Gln	
145	

<210> 28

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 28

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

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

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

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 29

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 29

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata	48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile	
1 5 10 15	
gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca	96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala	
20 25 30	
att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta	144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu	
35 40 45	
ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat	192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr	
50 55 60	
agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg ggt gga aaa aat ggt att gca	240
Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala	
65 70 75 80	
gca gat ata acc aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc	288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser	
85 90 95	
aac ggt gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa	336
Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu	
100 105 110	
tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca	384
Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr	
115 120 125	
aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc	432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys	
130 135 140	
gga agt gtc aca caa	447
Gly Ser Val Thr Gln	
145	

<210> 30

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 30

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

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

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

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 31

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 31

atg	aaa	tta	aca	aca	cag	caa	acc	ttg	aaa	aaa	ggg	ttt	aca	tta	ata	48
Met	Lys	Leu	Thr	Thr	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Lys	Gly	Phe	Thr	Leu	Ile	
1				5					10					15		
gag	cta	atg	att	gtg	att	gca	att	att	gct	att	tta	gcc	act	atc	gca	96
Glu	Leu	Met	Ile	Val	Ile	Ala	Ile	Ile	Ala	Ile	Leu	Ala	Thr	Ile	Ala	
			20					25					30			
att	ccc	tct	tat	caa	aat	tat	act	aaa	aaa	gca	gcg	gta	tct	gaa	tta	144
Ile	Pro	Ser	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Thr	Lys	Lys	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Leu	
		35					40					45				
ctg	caa	gcg	tca	gcg	cct	tat	aag	gct	gat	gtg	gaa	tta	tgt	gta	tat	192
Leu	Gln	Ala	Ser	Ala	Pro	Tyr	Lys	Ala	Asp	Val	Glu	Leu	Cys	Val	Tyr	
	50					55					60					
agc	aca	aat	gaa	aca	aca	aac	tgt	acg	ggg	gga	aaa	aat	ggg	att	gca	240
Ser	Thr	Asn	Glu	Thr		Asn	Cys	Thr	Gly	Gly	Lys	Asn	Gly	Ile	Ala	
65					70					75					80	
gca	gat	ata	acc	aca	gca	aaa	ggc	tat	gta	aaa	tca	gtg	aca	aca	agc	288
Ala	Asp	Ile	Thr	Thr	Ala	Lys	Gly	Tyr	Val	Lys	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	
				85					90					95		
aac	ggg	gca	ata	aca	gta	aaa	ggg	gat	ggc	aca	ttg	gca	aat	atg	gaa	336
Asn	Gly	Ala	Ile	Thr	Val	Lys	Gly	Asp	Gly	Thr	Leu	Ala	Asn	Met	Glu	
			100					105					110			
tat	att	ttg	caa	gct	aca	ggg	aat	gct	gca	aca	ggg	gta	act	tgg	aca	384
Tyr	Ile	Leu	Gln	Ala	Thr	Gly	Asn	Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Thr	Trp	Thr	
		115					120					125				
aca	act	tgc	aaa	gga	acg	gat	gcc	tct	tta	ttt	cca	gca	aat	ttt	tgc	432
Thr	Thr	Cys	Lys	Gly	Thr	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Pro	Ala	Asn	Phe	Cys	
	130					135					140					
gga	agt	gtc	aca	caa												447
Gly	Ser	Val	Thr	Gln												
145																

<210> 32

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 32

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

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

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

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser
85 90 95

Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Gln
145

<210> 33

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 33

atg	aaa	tta	aca	aca	cag	caa	acc	ttg	aaa	aaa	ggg	ttt	aca	tta	atc	48
Met	Lys	Leu	Thr	Thr	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Lys	Gly	Phe	Thr	Leu	Ile	
1				5					10					15		
gag	cta	atg	att	gtg	att	gca	att	att	gct	att	tta	gcc	act	atc	gca	96
Glu	Leu	Met	Ile	Val	Ile	Ala	Ile	Ile	Ala	Ile	Leu	Ala	Thr	Ile	Ala	
			20					25					30			
att	cct	tct	tat	caa	aat	tat	acc	aaa	aaa	gct	tcg	gta	tcc	gaa	tta	144
Ile	Pro	Ser	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Thr	Lys	Lys	Ala	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	
		35					40					45				
ctg	caa	gca	tct	gca	cct	tat	aag	gct	gat	gtg	gaa	tta	tgt	gta	tat	192
Leu	Gln	Ala	Ser	Ala	Pro	Tyr	Lys	Ala	Asp	Val	Glu	Leu	Cys	Val	Tyr	
	50					55					60					
agc	aca	aat	gaa	aca	aca	aac	tgt	acg	ggg	gga	aaa	aat	ggg	att	gca	240
Ser	Thr	Asn	Glu	Thr	Thr	Asn	Cys	Thr	Gly	Gly	Lys	Asn	Gly	Ile	Ala	
65					70					75					80	
gct	gat	att	aca	aca	gca	aaa	ggc	tat	gta	gcc	tca	gtg	aaa	act	caa	288
Ala	Asp	Ile	Thr	Thr	Ala	Lys	Gly	Tyr	Val	Ala	Ser	Val	Lys	Thr	Gln	
				85					90					95		
tcg	ggg	ggc	att	aca	gta	aaa	ggg	aat	ggc	aca	ttg	gca	aat	atg	gaa	336
Ser	Gly	Gly	Ile	Thr	Val	Lys	Gly	Asn	Gly	Thr	Leu	Ala	Asn	Met	Glu	
			100					105						110		
tat	att	ttg	caa	gct	aaa	ggg	aat	gct	aca	gca	ggg	gta	act	tgg	aca	384
Tyr	Ile	Leu	Gln	Ala	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr	Ala	Gly	Val	Thr	Trp	Thr	
		115					120					125				
aca	acc	tgc	aaa	gga	acg	gat	gcc	tct	tta	ttt	cca	gca	aat	ttt	tgc	432
Thr	Thr	Cys	Lys	Gly	Thr	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Pro	Ala	Asn	Phe	Cys	
		130				135					140					
aga	agt	gtc	aca	aaa												447
Arg	Ser	Val	Thr	Lys												
145																

<210> 34

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 34

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

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

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

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Arg Ser Val Thr Lys
145

<210> 35

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 35

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata	48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile	
1 5 10 15	
gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc acc atc gca	96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala	
20 25 30	
att cct tct tat aaa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta	144
Ile Pro Ser Tyr Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu	
35 40 45	
ctg caa gct tct gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat	192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr	
50 55 60	
agc aca aat gaa ata aca aat tgt atg ggt gga aaa aat ggt att gca	240
Ser Thr Asn Glu Ile Thr Asn Cys Met Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala	
65 70 75 80	
gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa	288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln	
85 90 95	
tcg ggt ggc att acc gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa	336
Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu	
100 105 110	
tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca gca ggt gta act tgg aca	384
Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Ala Gly Val Thr Trp Thr	
115 120 125	
aca acc tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc	432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys	
130 135 140	
gga agt atc aca caa	447
Gly Ser Ile Thr Gln	
145	

<210> 36

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 36

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

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

Ile Pro Ser Tyr Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu
35 40 45

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Asn Glu Ile Thr Asn Cys Met Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Ile Thr Gln
145

<210> 37

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 37

atg aaa tta aca aca ctg caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta atc Met Lys Leu Thr Thr Leu Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile 1 5 10 15	48
gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala 20 25 30	96
att cct tct tat caa aat tat acc aaa aaa gct gcg gta tcc gaa tta Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu 35 40 45	144
ctg caa gct tct gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgc gtt tat Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr 50 55 60	192
agc aca ggc aaa cct tct act tgc tca gga gga agc aat gga att gca Ser Thr Gly Lys Pro Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala 65 70 75 80	240
gct gat att acg aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln 85 90 95	288
tca ggt ggt att aca gta aaa ggg aat ggc aca ttg gca aat atg gaa Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu 100 105 110	336
tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr 115 120 125	384
aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys 130 135 140	432
gga agt gtc aca caa Gly Ser Val Thr Gln 145	447

<210> 38

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 38

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

<210> 39

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 39

atg aaa tta aca aca ctg caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta atc	48
Met Lys Leu Thr Thr Leu Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile	
1 5 10 15	
gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca	96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala	
20 25 30	
att cct tct tat caa aat tat acc aaa aaa gct gcg gta tcc gaa tta	144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu	
35 40 45	
ctg caa gct tct gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgc gtt tat	192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr	
50 55 60	
agc aca ggc aaa ctt tct act tgc tca gga gga agc aat gga att gca	240
Ser Thr Gly Lys Leu Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala	
65 70 75 80	
gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa	288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln	
85 90 95	
tca ggt ggt att aca gta aaa ggg aat ggc aca ttg gca aat atg gaa	336
Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu	
100 105 110	
tat att ttg caa gct aaa ggt aat gct aca gca ggt gta act tgg aca	384
Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr	
115 120 125	
aca acc tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc	432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys	
130 135 140	
gga agt gtc aca aaa	447
Gly Ser Val Thr Lys	
145	

<210> 40

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 40

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

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

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

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

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

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Gly Ser Val Thr Lys
145

<210> 41

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 41

```
atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggt ttt aca tta atc      48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile
1          5          10          15

gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca      96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20         25         30

att cct tct tat caa aat tat acc aaa aaa gct tcg gta tcc gaa tta     144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ser Val Ser Glu Leu
35         40         45

ctg caa gct tcc gca cct tat aag tca gat gtg gaa tta tgc gtt tat     192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ser Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50         55         60

agc aca ggc aaa cct tct act tgc tca gga gga agc aat gga att gca     240
Ser Thr Gly Lys Pro Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala
65         70         75         80

gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta gcc tca gtg aaa act caa     288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85         90         95

tca ggt ggt att aca gta aaa ggg aat ggc aca ttg gca aat atg gaa     336
Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100        105        110

tat att ttg caa gct aaa ggt aat gct aca gca ggt gta act tgg aca     384
Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115        120        125

aca acc tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc     432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130        135        140

aga agt gtc aca aaa
Arg Ser Val Thr Lys
145
```

<210> 42

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 42

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

Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala
20 25 30

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

Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ser Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr
50 55 60

Ser Thr Gly Lys Pro Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala
65 70 75 80

Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln
85 90 95

Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
100 105 110

Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr
115 120 125

Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys
130 135 140

Arg Ser Val Thr Lys
145

<210> 43

<211> 447

<212> ADN

<213> *H. influenzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<400> 43

atg aaa tta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata	48
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile	
1 5 10 15	
gag cta atg att gtg att gca att att gct att tta gcc act atc gca	96
Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala	
20 25 30	
att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gcg gcg gta tct gaa tta	144
Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu	
35 40 45	
ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat	192
Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr	
50 55 60	
agt aca ggt aaa cct tcc agt tgc tcg gga gga agc aat gga att gcg	240
Ser Thr Gly Lys Pro Ser Ser Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala	
65 70 75 80	
gct gat att aca aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc	288
Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser	
85 90 95	
aac ggt gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa	336
Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu	
100 105 110	
tat att ttg caa gcc agt ggt aat gct gca aca ggt gta act tgg aca	384
Tyr Ile Leu Gln Ala Ser Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr	
115 120 125	
aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc	432
Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys	
130 135 140	
gga agt gtc aca caa	447
Gly Ser Val Thr Gln	
145	

<210> 44

<211> 149

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<400> 44

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

Lisboa, 4 de Maio de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleótido isolado compreendendo:

(i) uma sequência nucleotídica codificando uma sequência de aminoácidos de qualquer um de: polipéptido Pila da SEQ ID N° 2, polipéptido Pila da SEQ ID N° 26, polipéptido Pila da SEQ ID N° 28, polipéptido Pila da SEQ ID N° 30, polipéptido Pila da SEQ ID N° 32, polipéptido Pila da SEQ ID N° 34, polipéptido Pila da SEQ ID N° 36, polipéptido Pila da SEQ ID N° 38, polipéptido Pila da SEQ ID N° 40, polipéptido Pila da SEQ ID N° 42 ou polipéptido Pila da SEQ ID N° 44; ou

(ii) uma sequência nucleotídica de qualquer um de: *pila* da SEQ ID N° 1, *pila* da SEQ ID N° 25, *pila* da SEQ ID N° 27, *pila* da SEQ ID N° 29, *pila* da SEQ ID N° 31, *pila* da SEQ ID N° 33, *pila* da SEQ ID N° 35, *pila* da SEQ ID N° 37, *pila* da SEQ ID N° 39, *pila* da SEQ ID N° 41 ou *pila* da SEQ ID N° 43.

2. Vector compreendendo um polinucleótido da reivindicação 1.

3. Polipéptido isolado compreendendo:

(i) uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência nucleotídica da reivindicação 1;

ou

(ii) uma sequência de aminoácidos de qualquer um de polipéptido Pila da SEQ ID N° 2, polipéptido Pila da

SEQ ID N° 26, polipéptido Pila da SEQ ID N° 28, polipéptido Pila da SEQ ID N° 30, polipéptido Pila da SEQ ID N° 32, polipéptido Pila da SEQ ID N° 34, polipéptido Pila da SEQ ID N° 36, polipéptido Pila da SEQ ID N° 38, polipéptido Pila da SEQ ID N° 40, polipéptido Pila da SEQ ID N° 42 ou polipéptido Pila da SEQ ID N° 44.

4. Fragmento peptídico isolado do polipéptido da reivindicação 3, em que o fragmento peptídico deduz uma resposta imunitária contra o polipéptido de pilina de *H. influenzae*.
5. Fragmento peptídico isolado do polipéptido da reivindicação 3, em que o fragmento peptídico inibe a aderência celular de *H. influenzae*.
6. Fragmento peptídico isolado do polipéptido da reivindicação 3, em que o fragmento peptídico compreende:
 - (i) aminoácidos 35 a 68 da SEQ ID N° 2;
 - (ii) aminoácidos 69 a 102 da SEQ ID N° 2;
 - (iii) aminoácidos 103 a 137 da SEQ ID N° 2; ou
 - (iv) aminoácidos 21 a 35 da SEQ ID N° 2.
7. Composição compreendendo um polipéptido da reivindicação 3 ou um fragmento peptídico de qualquer uma das reivindicações 4-6 e um veículo farmacêuticamente aceitável.
8. Anticorpo que se liga especificamente a uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em:

- a) a sequência de aminoácidos SEQ ID N° 2,
- b) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 26,
- c) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 28,
- d) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 30,
- e) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 32,
- f) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 34,
- g) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 36,
- h) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 38,
- i) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 40,
- j) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 42,
- k) a sequência de aminoácidos da SEQ ID N° 44,
- l) aminoácidos 35 a 68 da SEQ ID N° 2,
- m) aminoácidos 69 a 102 da SEQ ID N° 2,
- n) aminoácidos 103 a 137 da SEQ ID N° 2, ou
- o) aminoácidos 21 a 35 da SEQ ID N° 2.

- 9. Composição compreendendo um anticorpo da reivindicação 8 e um veículo farmacêuticamente aceitável.
- 10. Composição da reivindicação 7 ou 9, em que a composição é formulada para uma via de administração seleccionada do grupo consistindo em administração parentérica, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, rectal, intranasal, transdérmica, subcutânea, intramuscular ou vaginal.
- 11. Método para a detecção de bactérias NTHi numa amostra biológica, compreendendo:

(a) colocação em contacto de um polinucleótido da reivindicação 1, ou um seu fragmento tendo 15 nucleótidos ou mais, com uma amostra biológica, e

(b) detecção da hibridação do polinucleótido dentro da amostra, em que a hibridação indica a presença de bactérias NTHi.

12. Método para a detecção de bactérias NTHi numa amostra biológica, compreendendo:

(a) colocação em contacto de um anticorpo da reivindicação 8 com uma amostra biológica, e

(b) detecção da ligação do anticorpo dentro da amostra, em que a ligação indica a presença de bactérias NTHi.

13. Método da reivindicação 11 ou 12, em que a amostra biológica é seleccionada do grupo consistindo em soro, esputo, fluido auricular, sangue, urina, fluido linfático e fluido cerebroespinal.

14. Utilização de um ou mais polipéptidos da reivindicação 3 ou fragmentos peptídicos das reivindicações 4-6, para a preparação de um medicamento para a dedução de uma resposta imunitária contra bactérias NTHi.

15. Utilização de um ou mais polinucleótidos da reivindicação 1, para a preparação de um medicamento para a dedução de uma resposta imunitária contra bactérias NTHi.

16. Utilização da reivindicação 15, em que o polinucleótido está num plasmídeo ou vector viral.

17. Utilização de um oligonucleótido anti-sentido que inibe a expressão ou actividade de um polipéptido da reivindicação 3, para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de infecção bacteriana NTHi.
18. Utilização de um anticorpo que inibe a expressão ou actividade de um polipéptido da reivindicação 3, para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de infecção bacteriana NTHi.
19. Utilização de qualquer uma das reivindicações 14 a 18, em que o medicamento é formulado para uma via de administração seleccionada do grupo consistindo em administração parentérica, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, rectal, intranasal, transdérmica, subcutânea, intramuscular ou vaginal.
20. Utilização de qualquer uma das reivindicações 14 a 19, em que a infecção bacteriana NTHi envolve um estado patológico seleccionado do grupo consistindo em otite média, pneumonia, sinusite, septicemia, endocardite, epiglote, artrite séptica, meningite, sépsis, salpingite, epiglote, *pericardis*, celulite, osteomielite, endocardite, colecistite, infecções intra-abdominais, infecção do aparelho urinário, mastoidite, infecção de enxerto aórtico, conjuntivite, febre purpúrica Brasileira, bacteriemia oculta, bronquite crónica, bronquiectasia e fibrose quística.

21. Polipéptido de acordo com a reivindicação 3 ou um fragmento peptídico de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-6, para utilização na dedução de uma resposta imunitária contra bactérias NTHi.
22. Polinucleótido da reivindicação 1, para utilização na dedução de uma resposta imunitária contra bactérias NTHi.
23. Plasmídeo compreendendo, pelo menos, um polinucleótido da reivindicação 1 ou um vector viral compreendendo, pelo menos, um polinucleótido da reivindicação 1, em que o plasmídeo ou vector viral é para utilização na dedução de uma resposta imunitária contra bactérias NTHi.
24. Oligonucleótido anti-sentido que inibe a expressão ou actividade de um polipéptido da reivindicação 3, para utilização no tratamento ou prevenção de infecção bacteriana NTHi.
25. Anticorpo que inibe a expressão ou actividade de um polipéptido da reivindicação 3, para utilização no tratamento ou prevenção de infecção bacteriana NTHi.

Lisboa, 4 de Maio de 2010

Figura 1

Rd	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
86-028NP	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
1728MEE	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
1729MEE	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
3224A	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
10548MEE	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
1060MEE	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
1885MEE	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
1714MEE	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
1236MEE	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
1128MEE	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
214NP	NKLTTLQTLKKGFTLIELMI V I A I I A I L A T I A I P S Y Q N Y T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T S C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V A S V I F Q S G G I T V K G N G T L A N	110
Rd	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
86-028NP	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
1728MEE	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
1729MEE	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
3224A	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
10548MEE	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
1060MEE	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
1885MEE	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
1714MEE	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
1236MEE	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
1128MEE	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149
214NP	MEYI LQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTG	149

55 - 64

79 - 87