

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 081**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C07K 14/295 (2006.01)
A61K 39/118 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2011** **E 18157689 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2023** **EP 3399021**

54 Título: **Vacunas OMV**

30 Prioridad:

11.06.2010 GB 201009861

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

19.06.2023

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

GRIFANTINI, RENATA, MARIA;
FINCO, ORETTA;
BARTOLINI, ERIKA y
GRANDI, GUIDO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 944 081 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas OMV

Campo técnico

5 La invención está en el campo de vesículas de membrana externa que presentan un antígeno heterólogo sobre su superficie y sus usos.

Antecedentes

10 *C. trachomatis* es una bacteria Gram negativa que es un patógeno intracelular obligado. Es una causa común de infecciones del tracto urogenital, que lleva a una enfermedad inflamatoria pélvica (el 10-20 % de los casos), infertilidad y embarazo ectópico. Tales afecciones son comunes en los países industrializados y están causadas por los serotipos D-K.

C. trachomatis también es la causa principal de infecciones oculares, que dan como resultado tracoma (150 millones de casos al año) y ceguera (6 millones de casos al año), principalmente en países en desarrollo. Estas afecciones las causan los serotipos AC. La infección con los serotipos L1-L3 de *C. trachomatis* provoca linfogranuloma venéreo.

15 El desarrollo de vacunas se ha identificado como esencial para controlar la infección por *C. trachomatis*. Las vacunas contra *C. trachomatis* parecen depender de una respuesta inmunitaria mediada por células Th1 polarizadas, en particular, linfocitos CD4+ que producen IFN- γ . Por ejemplo, la reducción de los células T CD4+ en ratones da como resultado la pérdida de inmunidad protectora [1], y la transferencia adoptiva de células T CD4+ específicas de *Chlamydia* confiere protección frente a la exposición a *C. trachomatis* ([2], [3]). Además, los estudios recientes informan de que la infección por *C. trachomatis* en ratones induce una respuesta inmunitaria protectora de Th1-CD4, lo que indica que los antígenos importantes de *Chlamydia* se procesan y se presentan a través de la vía del MHC de clase II ([4]; [5]).

20 Es probable que la protección inmunitaria contra la infección por *C. trachomatis* esté mediada por la inmunización con proteínas de *C. trachomatis* que son dianas de células T CD4+ y que son capaces de inducir respuestas de células B. Se ha demostrado que las células B y los anticuerpos son importantes para potenciar la respuesta protectora de las células T efectoras contra infección primaria [6]. Los linfocitos B y los anticuerpos también desempeñan un papel importante en la resolución de la infección secundaria ([7], [8]).

Los anticuerpos neutralizantes han demostrado que desempeñan un papel importante en la protección frente a la infección por *Chlamydia*.

30 Muchos estudios sobre el candidato de vacuna más prometedor (la proteína principal de la membrana externa, PPME) han demostrado que es probable que una vacuna eficaz se base en varios antígenos de *C. trachomatis*. Las proteínas homólogas CT823 de *Chlamydia trachomatis* (Ct) y TC0210 de *Chlamydia muridarum* (Cm) se anotan como serina proteasas y comparten una identidad de secuencia del 93,36 por ciento. Los estudios previos, con análisis de espectrometría de masas y citofluorometría sobre CT823 han confirmado su localización sobre la superficie de la bacteria [9]. El antígeno CT823 es capaz de inducir una respuesta específica de Th1-CD4 en esplenocitos aislados de ratones infectados por *C. trachomatis* y se ha predicho que contienen epítopos del MHC de clase II ([10]; [11]).

35 Es un objeto de la invención proporcionar un vehículo para administrar antígenos tales como el CT823 de *Chlamydia* en formulaciones de vacuna.

DIVULGACIÓN

40 La presente invención proporciona una vesícula de membrana externa (OMV) que presenta un antígeno heterólogo en su superficie, en la que la OMV se obtiene a partir de una bacteria Gram negativa que es un mutante ompA, en la que la bacteria no expresa la proteína OmpA y, además, puede estar mutada en uno o más componentes del complejo Tol-Pal. El complejo Tol-Pal se muestra en la Figura 1a.

45 Las bacterias Gram negativas desprenden de forma natural OMV que se liberan en el medio de crecimiento. Los antígenos heterólogos se expresan en las bacterias Gram negativas de manera que se ensamblan en la membrana que después se libera en el sobrenadante del cultivo. Las VME de las bacterias Gram negativas son representativas de la membrana externa y de los compartimentos periplásmicos bacterianos y permiten la presentación de proteínas de membrana en su composición y conformación natural. Como las VME llevan las proteínas recombinantes en la conformación adecuada, representan una excelente elección como vehículos de administración para proteínas heterólogas de membrana.

50 El uso de OMV para expresar proteínas de la membrana externa se describe en el documento WO 2002/062380 (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.). El documento WO 2002/062380 desvela una VME de bacteria Gram negativa que presenta en su superficie una o más proteínas de la membrana externa de *Chlamydia*. Es sabido que es preferente la presentación de la proteína de membrana externa PorB de *C. trachomatis*. También se ha descrito la presentación de las proteínas de la membrana externa PmpG y MOMP de *C. trachomatis*.

El documento WO 2002/062380 describe procedimientos para optimizar la proteína de membrana externa (OMP) y la composición de LPS de vacunas de OMV ("ampolla") por la delección de OMP variables inmunodominantes, así como también OMP no de protección, creando OMP conservadas mediante la delección de regiones variables, mediante la regulación por acumulación de la expresión de las OMP y mediante la eliminación de los mecanismos de control para la expresión de OMP de protección.

El documento WO 2006/046143 (Novartis Vaccines & Diagnostics, SRL) desvela que la alteración de las trayectorias implicadas en la degradación del peptidoglicano (la capa de mureína) da bacterias que liberan vesículas en su medio de cultivo, y que estas vesículas son ricas en proteínas de membrana externa inmunogénicas y pueden generar respuestas inmunitarias bactericidas de amplio alcance. En particular, los inventores del documento WO 2006/046143 descubrieron que la supresión del homólogo meningocócico de *mltA* da bacterias que liberan de manera espontánea vesículas que son ricas en proteínas de la membrana externa inmunogénicas y que pueden generar respuestas de anticuerpos con reactividad cruzada con mayores títulos bactericidas que las VME preparadas mediante procesos de producción normales. También se describe la *E. coli* que tiene una supresión de uno o más de los componentes del complejo Tol-Pal, tales como *tolA*, *tolQ*, *tolB*, *pal* y/o *tolR*.

Inesperadamente, los inventores han descubierto que el uso de las OMV de la presente invención como vehículos de administración permite que la antigenicidad de los antígenos prometedores aumente en comparación a cuando los antígenos se administran en su forma purificada. Por ejemplo, se ha descubierto que los antígenos que no son protectores cuando se ensayan en un modelo animal de *Chlamydia* cuando se administran en su forma purificada, pueden llegar a ser protectores cuando se presentan en una VME de la invención.

Bacterias

También se describe una bacteria mutante que expresa un antígeno heterólogo. Esta permite la producción de OMV a partir de una bacteria de elección. La bacteria a partir de la cual se prepara la OMV puede ser Gram-positiva, pero preferentemente es Gram-negativa. La bacteria puede ser cualquier bacteria adecuada, por ejemplo, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria meningitidis* o *N. gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Helicobacter* o *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*.

La bacteria puede ser del género *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*. Puede utilizarse cualquier cepa de *E. coli* adecuada. Por ejemplo, la *E. coli* puede ser de la cepa BL21, por ejemplo, *E. coli* BL21(DE3). Inesperadamente, los inventores de la presente han descubierto que el uso de una cepa BL21(DE3) de *E. coli* es un excelente vehículo de administración para presentar antígenos heterólogos. Por ejemplo, bacterias de las cepas K1 o K12.

La bacteria se habrá generado típicamente por mutación de al menos un componente del complejo Tol-Pal y/o del gen *OmpA* en una cepa de partida seleccionada.

Cuando la bacteria no es *E. coli*, la bacteria puede tener una mutación del homólogo del gen *ompA* y/o de uno o más componentes del homólogo del complejo Tol-Pal de *E. coli*.

Uno o más componentes del complejo Tol-Pal (por ejemplo, 2, 3, 4, 5) de *E. coli* puede estar mutado. En la Figura 1a se muestra un diagrama esquemático del complejo Tol-Pal (véase también [12], [13], [14]). Puede estar mutada cualquier combinación de *tolA*, *tolQ*, *tolB*, *pal* y/o *tolR*. Por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o todas las *tolA*, *tolQ*, *tolB*, *pal* y/o *tolR* pueden estar mutadas. Por ejemplo, una o más (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más o todas) de *tolA*, *tolQ*, *tolB*, *pal* y/o *tolR* pueden estar mutadas. Se prefiere la mutación de *tolR*.

Como también se ha descrito en la presente memoria, la OMV se obtiene de una bacteria que presenta un antígeno heterólogo en su superficie y que es un mutante *ompA* que no expresa la proteína *OmpA*. Como también se ha descrito en la presente memoria, la OMV se obtiene a partir de una bacteria que es un mutante de *ompA* y un mutante en al menos un componente de su complejo Tol-Pal, por ejemplo, un mutante de *tolR*. La OMV puede obtenerse de una bacteria que es un mutante de *ompA*, pero que es el tipo silvestre en los genes que codifican el complejo Tol-Pal, o que expresa un complejo Tol-Pal funcional. Si la bacteria es un mutante *ompA*, la bacteria puede ser de tipo silvestre en su gen *tolR* o expresar una proteína *TolR* funcional. La bacteria puede ser un mutante *ompA* y todos los demás genes pueden ser genes de tipo silvestre.

La bacteria puede ser una mutante *ompA* de *E. coli* o una mutante *ompA* y *tolR* de *E. coli*. La bacteria puede seleccionarse de *E. coli* BL21(DE3) Δ *ompA*, *E. coli* BL21(DE3) Δ *ompA* Δ *tolR*, o *E. coli* BL21(DE3) Δ *tolR*. El símbolo Δ se usa en el presente documento para referirse a una cepa bacteriana en la que se ha delecionado la secuencia codificante del gen citado tras el símbolo Δ . Por lo tanto, una cepa bacteriana que es " Δ *ompA*" no comprende la secuencia codificante para el gen *ompA*. Asimismo, una cepa bacteriana que es " Δ *tolR*" no comprende la secuencia de codificación para el gen *tolR*. Puede suprimirse toda la secuencia de codificación. Sin embargo, la secuencia codificante puede estar parcialmente delecionada. Por ejemplo, se puede delecionar la mitad de N-terminal o la mitad de C-terminal.

Los presentes inventores sorprendentemente han descubierto que las cepas mutantes *E. coli* Δ tolR y las cepas mutantes *E. coli* Δ ompA sobreproducen VME en comparación con la *E. coli* de tipo silvestre. Por lo tanto, la mutación del gen ompA y/o uno o más componentes del complejo Tol-Pal preferentemente da como resultado una bacteria mutante que produce un aumento en el número de VME en comparación con su respectiva cepa de tipo silvestre que lleva un gen ompA y un complejo Tol-Pal de tipo silvestre. OmpA es una proteína integral de membrana y es la más abundante de las proteínas de membrana externa en *E. coli*. Es, por lo tanto, particularmente sorprendente que una *E. coli* que carece de la proteína OmpA sea viable. De hecho, de acuerdo con Murakami y col. [15], una *E. coli* de mutación única de ompA no puede promover la liberación de vesículas.

Las bacterias de hiperformación de ampollas a partir de las cuales se pueden formar más fácilmente ampollas vesículas con mayor rendimiento y que pueden ser más homogéneas en la naturaleza se describen en el documento WO 02/062378 (Smithkline Beecham Biologicals S.A.). Las ampollas provienen de bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Moraxella catarrhalis*. Tales bacterias se han modificado genéticamente mediante regulación negativa de la expresión de uno o más genes tol y mutaciones de uno o más genes que codifican una proteína que comprende un sitio asociado a peptidoglicano para atenuar la actividad de unión a peptidoglicano de la(s) proteína(s) mientras se asegura que la proteína truncada se pliega correctamente en la membrana externa.

Los presentes inventores sorprendentemente han descubierto que las VME de las cepas mutantes *E. coli* Δ ompA expresan un mayor porcentaje de proteínas de la membrana externa en comparación con las cepas mutantes *E. coli* Δ tolR (véase el Ejemplo 9). Por lo tanto, la bacteria mutante expresa un mayor porcentaje de proteínas de la membrana externa en comparación con su respectiva cepa de tipo silvestre, más preferentemente, en comparación con una cepa mutante de tolR. En algunas realizaciones, la OMV producida a partir de la bacteria puede expresar un mayor porcentaje de proteínas de la membrana externa en comparación con una OMV de la respectiva cepa de tipo silvestre de la bacteria, más preferentemente, en comparación con un mutante de tolR de la misma cepa. Por ejemplo, la composición de proteína de la OMV puede comprender 60 % o más de proteínas de membrana externa. En algunas realizaciones, la composición de proteína de la OMV puede comprender al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de las proteínas de membrana externa. La composición de proteína de la OMV puede comprender al menos 98 % o al menos 99 % de las proteínas de membrana externa. La OMV puede comprender 100% de proteínas de membrana externa. La composición de proteína de la OMV puede comprender 25 % o menos de las proteínas citoplasmáticas (por ejemplo, 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos, 5% o menos, 3% o menos, 2% o menos, 1% o menos). La OMV puede no comprender proteínas citoplasmáticas. El porcentaje de proteínas de membrana externa y proteínas citoplasmáticas puede ser evaluado preferentemente de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

Inesperadamente, los inventores de la presente también han descubierto que una OMV de la presente invención de una cepa mutante Δ ompA de *E. coli*, que presenta un antígeno heterólogo en su superficie, en la que la bacteria no expresa una proteína de ompA, expresa una cantidad elevada del antígeno heterólogo en comparación con una OMV de una cepa mutante Δ tolR de *E. coli* (véase el Ejemplo 10). Por lo tanto, la bacteria mutante puede expresar una cantidad elevada del antígeno heterólogo en comparación con su respectiva cepa de tipo silvestre, más preferentemente en comparación con una cepa mutante de tolR. La OMV producida a partir de la bacteria puede expresar una mayor cantidad del antígeno heterólogo en comparación con una OMV de la respectiva cepa de tipo silvestre de la bacteria, más preferentemente, en comparación con una OMV producida por un mutante de tolR de la misma cepa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la VME de la invención expresa el 105 % o más (por ejemplo, el 110 % o más, el 125 % o más, el 150 % o más, el 175 % o más, el 200 % o más o el 250 % o más) de antígeno heterólogo en comparación con una VME de la respectiva cepa de tipo silvestre de la bacteria, o más preferentemente, en comparación con una VME de un mutante de tolR de la misma cepa.

La mutación del gen ompA y/o uno o más componentes del complejo Tol-Pal es preferentemente una mutación de inactivación. Por ejemplo, una parte o toda la secuencia génica se puede delecionar de manera que no se exprese la proteína. Como también se describe en la presente memoria, se puede eliminar un fragmento de la secuencia de codificación, por ejemplo, al menos 20 %, al menos 40 %, al menos 60 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % de la secuencia de codificación. Por lo tanto, la proteína expresada puede carecer de un dominio o de más de uno. La mutación puede ser una delección de la secuencia de codificación completa de la proteína OmpA y (opcionalmente) el al menos un componente del complejo Tol-Pal. Esto da como resultado que la bacteria no exprese la proteína OmpA y (opcionalmente) al menos un componente del complejo Tol-Pal (preferentemente TolR). Por consiguiente, la OMV no expresa la proteína OmpA y (opcionalmente) el al menos un componente del complejo Tol-Pal.

El al menos un componente del complejo Tol-Pal o la proteína OmpA se puede inactivar mediante cualquier procedimiento adecuado. El al menos un componente del complejo Tol-Pal y/o el gen ompA se puede delecionar usando técnicas de ADN recombinante, tal como técnicas de recombinación homóloga. Tales técnicas son bien conocidas en la materia (por ejemplo, usar la tecnología recombinante Red/ET tal como el kit de delección génica de *E. coli* de Gene Bridges, GmbH) [16]. Por ejemplo, el al menos un componente del complejo Tol-Pal y/o el gen ompA se pueden sustituir con un casete de resistencia a antibióticos como un marcador de selección. El gen tolR puede

sustituirse con un gen de resistencia a la kanamicina mediante recombinación homóloga, tal como se muestra en la Figura 1b.

Como también se describe en la presente memoria, las una o más mutaciones en al menos un componente del complejo Tol-Pal y/o el gen *ompA*, pueden ser independientemente una sustitución, una inserción o una delección. Por ejemplo, cada mutación puede implicar un único aminoácido, tal como una mutación puntual. Un truncamiento es un ejemplo de una delección. Los truncamientos pueden implicar la delección de hasta 10, hasta 20, hasta 30 o hasta 40 (o más) aminoácidos en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal. Preferentemente, tales mutaciones dan como resultado la producción de una proteína no funcional.

Bacterias mutantes - expresión de otros genes

Las OMV de un mutante doble de *E. coli* que carece tanto de la lipoproteína de Braun (*lpp*) y de *OmpA* se describen en el documento US 6.558.677. La bacteria puede tener un gen de lipoproteína de Braun de tipo silvestre. La bacteria puede expresar una versión mutada pero funcional de la lipoproteína de Braun.

Murakami et al. [15] desvelan que un mutante *ompA* de *E. coli* por sí mismo podría no promover la liberación de vesículas; sin embargo, los mutantes *ompA*, *pal* y las principales lipoproteínas *lpp* formaron grandes cantidades de vesículas. Por lo tanto, la OMV puede ser de una bacteria que es de tipo silvestre en sus genes de *pal* y de las lipoproteínas *lpp* principales. La bacteria puede expresar una versión mutada pero funcional de los genes de *pal* y de las lipoproteínas principales.

Bacterias mutantes - mutaciones de otros genes

Como también se describe en la presente memoria, además de tener una mutación del gen *ompA* y/u uno o más componentes del complejo Tol-Pal, la bacteria puede tener una o más mutaciones de otros genes. Para reducir la actividad pirógena, por ejemplo, la bacteria podría tener bajos niveles de endotoxina (lipo-oligosacárido (LOS) / lipopolisacárido (LPS)), y esto se puede lograr mediante inactivación de las enzimas implicadas en la biosíntesis de LPS. Las OMV de la invención preferentemente contienen no más de 20 % en peso de LOS/LPS, medido en relación con la proteína total (es decir, debe ser de al menos 4 veces más proteína que LOS/LPS, en peso). El nivel máximo de LOS/LPS es preferentemente incluso menor que 20 %, por ejemplo, 15 %, 10 %, 5 %, o menor. Los procesos para preparar membranas externas bajas en LPS de bacterias Gram negativas se desvelan en la Patente Europea No. 0624376.

Además de tener mutaciones o inactivaciones de genes endógenos particulares, la bacteria puede expresar uno o más genes no endógenos. Por ejemplo, puede utilizarse una cepa recombinante que expresa nuevos genes en relación con la correspondiente cepa de tipo silvestre. La expresión de los genes no endógenos de este modo se puede lograr mediante diversas técnicas, por ejemplo, inserción cromosómica, mutaciones de activación, expresión a partir de vectores extracromosómicos, por ejemplo, a partir de plásmidos, etc.

Adicionalmente, además de regular por disminución la expresión de proteínas específicas, en algunas realizaciones la bacteria puede sobreexpresar (en relación con la correspondiente cepa de tipo silvestre) otros inmunógenos.

Composiciones de vesículas

La invención proporciona las OMV de bacterias Gram negativas que son mutantes de *ompA*, que presentan un antígeno heterólogo en sus superficies, en las que las bacterias no expresan la proteína *OmpA*, que son liberados espontáneamente en el medio de cultivo por las bacterias descritas en la presente memoria. Estas OMV son diferentes de las vesículas que se pueden preparar de manera artificial a partir de las mismas bacterias, tal como las OMV extraídas con sarkosil preparadas en Adu-Bobie et al. [17] de meningococos 'ΔGNA33'. También son diferentes de las microvesículas (MV [18]) y las 'VME naturales' ('VMEN' [19]), aunque las vesículas de la invención parecen ser más similares a las MV y a las VMEN que a las VME extraídas por sarkosil. Las vesículas también son diferentes de las ampollas, que son protrusiones de la membrana externa que permanecen unidas a las bacterias antes de liberarse como MV([20]; [21]).

Las vesículas de la invención tienen un diámetro de 50-100 nm mediante microscopía electrónica, que es más pequeño que el de las OMV artificiales de meningococo (diámetro de ~270 nm, [22]). El diámetro es aproximadamente igual que el de las OMV artificiales que se han desnaturalizado térmicamente (~105 nm, [22]), pero las vesículas de la invención conservan su antigenicidad mientras que las OMV artificiales desnaturalizadas térmicamente pierden su antigenicidad. Además, las VME de la invención están sustancialmente libres de contaminación citoplasmática.

A diferencia del cultivo inicial, las composiciones que contienen OMV de la invención generalmente estarán sustancialmente libres de bacterias completas, tanto vivas como muertas. El tamaño de las VME de la invención implica que se puedan separar fácilmente de las bacterias completas mediante filtración a través de un filtro de 0,22 μm, por ejemplo, como el que se usa típicamente para la esterilización por filtración. Por lo tanto, también se describe en la presente memoria un procedimiento para preparar OMV de la invención, que comprende filtrar el medio de cultivo de bacterias de la presente memoria a través de un filtro que retiene a las bacterias completas pero deja que las OMV pasen a través del mismo, por ejemplo, un filtro de 0,22 μm. Aunque las OMV pasarán a través de filtros estándares

de 0,22 μm , estos se pueden obstruir fácilmente por otro material, y por lo tanto es preferente realizar etapas secuenciales o esterilización por filtración a través de una serie de filtros con reducción de tamaño de poro, finalizando con un filtro de esterilización estándar (por ejemplo, un filtro de 0,22 μm). Los ejemplos de los filtros anteriores pueden ser aquellos con un tamaño de poro de 0,8 μm , 0,45 μm , etc. El filtrado se puede tratar adicionalmente por ejemplo mediante ultracentrifugación.

Combinaciones de vesículas

También se describen en la presente memoria procedimientos para preparar OMV a partir de más de una cepa bacteriana, y las OMV de las diferentes bacterias pueden combinarse, proporcionando así una composición que comprende una mezcla de n conjuntos de OMV de la invención, preparados a partir de n cepas diferentes de una bacteria. El valor de n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, etc. Las diferentes cepas pueden ser del mismo serogrupo o de serogrupos distintos.

También se describe en la presente memoria un kit que comprende OMV de la invención preparadas a partir de n cepas diferentes de una bacteria. Las OMV se pueden mantener y almacenar de manera separada en el kit hasta que se requiera su uso en conjunto, por ejemplo, como una mezcla, o para uso simultáneo, separado o secuencial.

También se describe en la presente memoria un procedimiento que comprende: preparar n conjuntos de OMV de la invención, uno de cada una de las n cepas diferentes de una bacteria; y combinar los n conjuntos de OMV. Los diferentes conjuntos se pueden combinar en un kit o en una mezcla.

Además de estar seleccionadas a partir de diferentes cepas de una bacteria, tal como diferentes cepas de *Escherichia*, las OMV se pueden seleccionar a partir de diferentes géneros de bacterias, o a partir de diferentes patógenos. Por lo tanto, también se describe en la presente memoria una composición que comprende una mezcla de n conjuntos de OMV de la invención, preparada a partir de n especies diferentes de bacterias. De manera similar, también se describe en la presente memoria un kit que comprende OMV de la invención preparadas a partir de n especies diferentes de bacterias, y un procedimiento que comprende la etapa de preparar n conjuntos de OMV de la invención, uno de cada una de las n especies diferentes de bacterias.

Diferentes antígenos heterólogos se expresan sobre diferentes OMV.

Antígenos heterólogos

Un antígeno "heterólogo" es un antígeno que proviene de una especie patógena que es diferente de la especie de bacteria de la que se obtiene la OMV, y es preferentemente un antígeno de un género de patógeno diferente del género de bacteria del que se obtiene la OMV.

El antígeno heterólogo es preferentemente de una bacteria o virus. Por ejemplo, el antígeno heterólogo puede ser un antígeno bacteriano, tal como un antígeno de *Chlamydia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia pestis*, *Rickettsia prowazekii*, *Neisseria* o *Helicobacter*. El antígeno heterólogo puede ser un antígeno vírico, tal como un antígeno de un virus de la familia *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Papovaviridae*, *Rhabdoviridae* o *Togaviridae*, por ejemplo, un antígeno del VIH o de la gripe.

El antígeno heterólogo puede ser un antígeno de *Chlamydia*, por ejemplo, un antígeno de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. muridarum* o *C. suis*. Cuando el antígeno heterólogo es de *Chlamydia*, la bacteria de la que se obtiene la vesícula de la membrana externa no es de la misma especie de *Chlamydia* y preferentemente no es del género *Chlamydia*.

Las serovariedades humanas ("serotipos") de *C. trachomatis* se dividen en dos biovariedades ("biotipos"). Los serotipos A-K generan infecciones principalmente en el tejido ocular (A-C) o en el tracto urogenital (D-K). Los serotipos L1, L2 y L3 son los agentes de linfogranuloma venéreo (LGV) invasivo. El antígeno heterólogo se puede seleccionar de uno cualquiera de los serotipos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2 o L3. Preferentemente, el antígeno heterólogo es del serotipo D de *C. trachomatis*, o de otro serotipo con prevalencia epidemiológica.

Preferentemente, el antígeno heterólogo es una proteína de membrana, más preferentemente, una proteína de membrana externa.

Los ejemplos de antígenos de *C. trachomatis* que son adecuados para uso en la presente invención son CT823, CT601, CT372, CT443, CT043, CT733, CT279, CT153 y MOMP (CT681). Los ejemplos de antígenos de *C. muridarum* que son adecuados para su uso en la presente invención son TC0210, TC0052, TC0106, TC0313, TC0431, TC0551, TC0651, TC0727 y TC0890. Los ejemplos de otros antígenos adecuados para su uso en la invención son TC0660 y TC0741.

El antígeno heterólogo puede ser CT823 o TC0210. Las secuencias de CT823 y TC0210 se presentan en la Figura 9. CT823 de *Chlamydia trachomatis* (Ct) y TC0210 de *Chlamydia muridarum* (Cm) son homólogos de proteína que se anotan como serina proteasas y comparten el 93,36 por ciento de identidad de secuencia. Junto con la proteína A de

requerimiento de alta temperatura (HtrA) de *E. coli* y los homólogos en otras bacterias y eucariotas, estas proteínas constituyen la familia de proteasas de HtrA. El papel principal de estas proteasas es degradar las proteínas mal plegadas en el periplasma ([23]; [24]; [25]). La HtrA de *Chlamydia trachomatis* (también citada en el presente documento como "CtHtrA" o "CT823") se ha caracterizado como una serina endoproteasa, específica para proteínas no plegadas, que se activa a temperaturas por encima de los 34 °C ([26]). Se ha observado la actividad chaperona, aunque esto parece ser dependiente de la diana.

CT823 es una proteína de membrana externa. Para que se genere una respuesta inmune protectora contra este antígeno heterólogo, el antígeno heterólogo se debería presentar preferentemente en su estado correctamente plegado.

Inesperadamente, los inventores han descubierto que la expresión de TC0210 en una OMV mutante de acuerdo con la invención da como resultado una respuesta inmunitaria neutralizante que se genera tanto contra *C. muridarum* como contra *C. trachomatis*. La respuesta inmunitaria se mejora en comparación con la respuesta generada mediante el antígeno TC0210 purificado (es decir, cuando no se expresa en una VME).

El antígeno heterólogo es preferentemente el antígeno de tipo silvestre. Sin embargo, en algunas realizaciones, el antígeno heterólogo es una variante de un antígeno de tipo silvestre. Por ejemplo, la variante puede tener al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con el antígeno de tipo silvestre. Los procedimientos de determinación de identidad de secuencia son bien conocidos en la materia. La identidad entre antígenos heterólogos se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología que se implementó en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda de hueco afín con penalización por hueco abierto = 12 y penalización por extensión del hueco = 2. Tales variantes incluyen homólogos, ortólogos, variantes alélicas y mutantes funcionales. En realizaciones en las que el antígeno heterólogo es una variante de un antígeno de tipo silvestre, la inmunogenicidad de la variante es preferentemente la misma que o muy similar a la inmunogenicidad del antígeno de tipo silvestre cuando se ensaya en las mismas condiciones, tal como cuando se usa en un ensayo ELISA o en un ensayo de neutralización.

Cuando el antígeno heterólogo es una variante de un antígeno de tipo silvestre, la secuencia de aminoácidos de la variante contiene preferentemente menos de veinte mutaciones (por ejemplo, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1) en relación con la secuencia de tipo silvestre. Cada mutación preferentemente implica a un único aminoácido y es preferentemente una mutación puntual. Las mutaciones pueden ser cada una independientemente una sustitución, una inserción o una delección. Las mutaciones preferidas son sustituciones de un solo aminoácido. La variante también puede incluir una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) delecciones de un solo aminoácido en relación con las secuencias de tipo silvestre. La variante también puede incluir una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) inserciones (por ejemplo, cada una de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) en relación con las secuencias de tipo silvestre. Las delecciones, sustituciones o inserciones pueden ser en el extremo N-terminal y/o C-terminal, o pueden estar entre los dos extremos. Por lo tanto, un truncamiento es un ejemplo de una delección. Los truncamientos pueden implicar la delección de hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40 (o más) aminoácidos en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser para uno cualquiera de los otros diecinueve aminoácidos de origen natural. En realizaciones preferidas, una o más mutaciones es una sustitución conservativa. En otra realización, una o más mutaciones es una sustitución no conservativa. Una sustitución conservadora se define comúnmente como una sustitución que introduce un aminoácido que tiene propiedades química suficientemente similares, por ejemplo, que tiene una cadena lateral relacionada (por ejemplo, un aminoácido básico cargado positivamente se sustituiría por otro aminoácido básico cargado positivamente), para conservar la estructura y la función biológica de la molécula. Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácidos, es decir, aspartato, glutamato; (2) básicos, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polares, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican juntos como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de un solo aminoácido en estas familias no tienen un mayor efecto sobre la actividad biológica. Los ejemplos adicionales de sustituciones conservativas que se pueden usar en la invención se presentan en la Tabla I.

TABLA 1

Aminoácido	Grupos sinónimos	Grupos sinónimos más preferidos
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

Los ejemplos de sustituciones no conservadoras que se pueden usar en la invención incluyen la sustitución de un aminoácido polar sin carga por un aminoácido no polar, la sustitución de un aminoácido no polar por un aminoácido polar sin carga, la sustitución de un aminoácido ácido por un aminoácido básico y la sustitución de un aminoácido básico por un aminoácido ácido.

En algunas realizaciones en las que el antígeno heterólogo es una variante de un antígeno de tipo silvestre, la variante puede comprender uno o más derivados de aminoácidos. Por "derivado de aminoácido" se entiende un aminoácido o compuesto químico similar a aminoácido que no sea uno de los 20 aminoácidos de origen natural codificados genéticamente. En particular, el derivado de aminoácido puede contener restos alquilo lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, y puede incluir uno o más heteroátomos. Los derivados de aminoácidos se pueden preparar de novo o se pueden obtener de fuentes comerciales (Calbiochem-Novabiochem AG, Suiza; Bachem, Estados Unidos).

En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo comprende o consiste en un fragmento de un antígeno de tipo silvestre o en una variante del mismo. El fragmento debe comprender al menos n aminoácidos consecutivos del antígeno de tipo silvestre o de una variante del mismo y, dependiendo de la secuencia particular, n es 5 o más, 6 o

más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 15 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más (por ejemplo, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480 o más). Tales fragmentos no comprenden la secuencia de longitud completa del antígeno de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el fragmento es de 481 aminoácidos o menos de longitud (por ejemplo, 400 o menos, 300 o menos, 200 o menos, 100 o menos, 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 25 o menos, 22 o menos o 20 o menos aminoácidos de longitud).

Preferentemente, el fragmento comprende uno o más epítomos del antígeno de tipo silvestre. Tales epítomos se pueden definir usando técnicas de mapeo de epítomos tales como las descritas en el Ejemplo 8. En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo es un fragmento del antígeno TC0210 de *C. muridarum*. Por ejemplo, el fragmento puede comprender o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en DYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 36), SHREQ (SEQ ID NO: 37), ALQKMGVRVQNLTPE (SEQ ID NO: 38), NQVLKNAKGENVLLM (SEQ ID NO: 39), SPMLGYSAPKKDSSTGICLA (SEQ ID NO: 40), EDLLKEVSRGFSKVAAQATP (SEQ ID NO: 41), TGSQAIASPGNKRGFQENPF (SEQ ID NO: 42), PRPQQRDAVR (SEQ ID NÚM.: 43), IAIGNPFGLQATVTVGVISAKGRNQLHIVD (SEQ ID NÚM.: 44) y NTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMAKRVIDQL (SEQ ID NO: 45). Por ejemplo, puede comprender o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en DYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 36), SHREQ (SEQ ID NO: 37), ALQKMGVRVQNLTPE (SEQ ID NO: 38) y NQVLKNAKGENVLLM (SEQ ID NÚM.: 39) DYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 36) es particularmente preferido.

En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo es un fragmento del antígeno TC0210 de *C. muridarum* que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en VAAQATPGVVYIENFPK (SEQ ID NÚM.: 46), GFQENPFQDYFNDEFFNRFFGLPSHREQPRPQQR (SEQ ID NO: 47), GTGFIVSEGDGYVVTNHHVVEDAGK (SEQ ID NÚM.: 48), TDLAVIKIQAK (SEQ ID NÚM.: 49), VIDQLISDGQVTR (SEQ ID NO: 50), AGLRQEDVIVAYNGKEVESLSALR (SEQ ID NO: 51), FIEIPVTVTQIPAEQGVSAALQK (SEQ ID NO: 52), VQNLTPICK (SEQ ID NO: 53), NAKGENVLLMVSQGEVIR (SEQ ID NO: 54) y GENVLLMVSQGEVIR (SEQ ID NO: 55).

En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos correspondientes del antígeno CT823 de *C. trachomatis*. Por ejemplo, el fragmento puede comprender o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en DYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 56), SHREQ (SEQ ID NO: 57), ALQKMGVRVQNITPE (SEQ ID NO: 58), NQVLKNSKGENVLLM (SEQ ID NO: 59), SPMLGYSASKKDSKADICLA (SEQ ID NO: 60), EDLLKEVSRGFSRVAQATP (SEQ ID NO: 61), TGNQAIASPGNKRGFQENPF (SEQ ID NO: 62), IAIGNPFGLQATVTVGVISAKGRNQLHIVD (SEQ ID NO: 63) y NTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMAKRVIDQL (SEQ ID NO: 64). Por ejemplo, puede comprender o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en DYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 56), SHREQ (SEQ ID NO: 57), ALQKMGVRVQNITPE (SEQ ID NO: 58) y NQVLKNSKGENVLLM (SEQ ID NO: 59). DYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 56) es particularmente preferido.

Preferentemente, el antígeno heterólogo es inmunogénico cuando está presente en la OMV. En realizaciones en las que el antígeno heterólogo comprende o consiste en un fragmento de un antígeno de tipo silvestre o en una variante del mismo, el fragmento es preferentemente inmunogénico. El término "inmunogénico", en el contexto de un antígeno heterólogo inmunogénico, significa que el antígeno heterólogo es capaz de generar una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta mediada por células y/o una respuesta de anticuerpos, frente al patógeno (tal como una bacteria o un virus) del que proviene el antígeno, por ejemplo, frente al antígeno en el ámbito del patógeno. Preferentemente, la respuesta inmunitaria se genera frente al patógeno de tipo silvestre del que proviene el antígeno. Por ejemplo, tal respuesta inmunitaria se puede generar cuando la VME de la invención se usa para inmunizar a un sujeto (preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano o un ratón). En una realización, la OMV de la invención es capaz de estimular células CD4+ IFN- γ *in vitro* en esplenocitos purificados de ratones infectados con el patógeno vivo (tal como *C. trachomatis*) y/o genera anticuerpos que reconocen al patógeno (tal como *C. trachomatis*). El antígeno heterólogo preferentemente genera anticuerpos que reconocen el patógeno del que proviene el antígeno heterólogo. Por ejemplo, el antígeno heterólogo preferentemente genera anticuerpos que se pueden unir a, y preferentemente neutralizan la infección y/o la virulencia del patógeno del que proviene el antígeno heterólogo. Los antígenos heterólogos preferidos son aquellos que se reconocen mediante antisuero tras la infección por un patógeno de interés. Los más preferidos son aquellos antígenos heterólogos que generan una respuesta inmunitaria protectora frente a un patógeno de interés.

En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo es inmunogénico cuando está presente en la OMV pero no es inmunogénico cuando se administra en la forma purificada.

En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo presentado en la OMV de la invención genera una respuesta inmunitaria que es de reacción cruzada con un antígeno de una especie diferente del patógeno y por lo tanto, el antígeno heterólogo se puede usar para generar una respuesta inmunitaria frente a esa especie de patógeno diferente. Por ejemplo, cuando el antígeno heterólogo es de *C. muridarum*, la respuesta inmunitaria puede ser de reacción cruzada con un antígeno de *C. trachomatis* o *C. pneumoniae*. De manera similar, cuando el antígeno heterólogo es de *C. trachomatis*, la respuesta inmunitaria puede ser de reacción cruzada con un antígeno de *C. pneumoniae* o *C. muridarum*. Además, cuando el antígeno heterólogo es de *C. pneumoniae*, la respuesta inmunitaria puede ser de reacción cruzada con un antígeno de *C. trachomatis* o *C. muridarum*.

El antígeno heterólogo presentado sobre la superficie de la OMV está en la forma de un polipéptido que comprende o consiste en el antígeno heterólogo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el polipéptido contiene la secuencia de aminoácidos de N-terminal y/o C-terminal para el antígeno heterólogo.

Combinaciones con otros antígenos

5 En algunas realizaciones, una OMV de la invención presenta solo un antígeno heterólogo sobre su superficie. En otras realizaciones, una VME de la invención presenta más de un antígeno heterólogo sobre su superficie, por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco, seis o más, diez o más, quince o más, etc. Por ejemplo, la VME puede presentar TC0210 y un antígeno heterólogo adicional; o CT823 y un antígeno heterólogo adicional. El antígeno heterólogo adicional puede ser cualquier antígeno heterólogo tal como se describe en el presente documento, pero es preferentemente un antígeno de *Chlamydia*.

10 En realizaciones en las que la OMV comprende más de un antígeno heterólogo, los dos o más antígenos heterólogos pueden estar en la forma de polipéptidos separados o pueden estar presentes en el mismo polipéptido como una proteína de fusión. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender dos o más antígenos de longitud completa. Como alternativa, el polipéptido puede comprender una cadena de epítomos de antígenos heterólogos que son epítomos de uno o más antígenos. Por ejemplo, la cadena de epítomos puede comprender dos o más de los fragmentos de *C. muridarum* y/o *C. trachomatis* que se describen anteriormente. Los epítomos pueden estar unidos directamente sin ninguna secuencia intermedia o pueden estar unidos mediante una longitud de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 o más aminoácidos). En algunas realizaciones, una VME de la invención comprende una combinación de antígenos heterólogos que comprenden antígenos de tipos silvestre de longitud completa o variantes de los mismos y antígenos heterólogos que comprenden fragmentos de antígenos de tipo silvestre o variantes de los mismos.

20 En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende una primera OMV de la invención junto con uno o más antígenos adicionales. El uno o más antígenos adicionales puede estar en el ámbito de una VME tal como se describe en el presente documento, o se puede administrar en una forma alternativa, por ejemplo, como un antígeno purificado o como su ácido nucleico codificante. Preferentemente, el antígeno adicional es un antígeno heterólogo de acuerdo con la presente invención que es diferente del antígeno heterólogo presentado sobre la primera VME.

30 La invención también incluye una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos, por ejemplo, antígenos de *Chlamydia*, comprendiendo dicha combinación una OMV de la invención en combinación con uno o más antígenos adicionales, tal como antígenos de *Chlamydia*. También se proporciona una VME de la invención para un uso tal como se describe en el presente documento, en el que la VME es para su uso en combinación con uno o más antígenos de *Chlamydia* adicionales (o sus ácidos nucleicos codificantes). Los uno o más antígenos adicionales (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más antígenos adicionales) se pueden administrar de manera simultánea, de manera separada o de manera secuencial con la VME de la invención, por ejemplo, como una preparación combinada.

Los ejemplos de combinaciones de antígenos heterólogos para uso en la invención incluyen TC0106+TC0431; TC0660+TC0741; TC0551+TC0890; TC0106+TC0210+TC0741+TC0313; y TC0551+TC0890+TC106+TC431.

40 El documento PCT/IB2010/050988 (Novartis Vaccines and Diagnostics, SRL) desvela que la inmunización con tres combinaciones de estos antígenos (TC0106-TC0431; TC0660-TC0741; TC0551-TC0890) proporcionó una reducción significativa de IFU en los pulmones de ratones infectados por *C. muridarum*. La contribución de los antígenos individuales a la protección también se evaluó en el modelo de ratón, que lleva a la identificación de 4 antígenos (TC0106, TC0210, TC0741 y TC0313) que fueron capaces de reducir parcialmente la carga de IFU por pulmón (aproximadamente 0,5-1 Log). Se evaluó entonces si se podría lograr una mayor protección administrando combinaciones de 4 antígenos. En comparación con la combinación de 2 antígenos, la combinación de 4 antígenos (TC0551+TC0890+TC0106+TC0431) pareció tener un efecto protector aditivo en la reducción de la acumulación de bacterias en el pulmón, (reducción de 2,2 log₁₀ con P=0,0003). También se observó una eficacia ligeramente mayor en la aceleración de la eliminación bacteriana, con el 29 % de los animales recuperándose por completo de la infección.

50 En una realización, los uno o más antígenos son antígenos de *Chlamydia* seleccionados de los antígenos presentados en la Tabla 2. Por ejemplo, uno o más (por ejemplo, todos) de los antígenos adicionales se seleccionan de los antígenos de *Chlamydia trachomatis* enumerados en la Tabla 2, pero se pueden seleccionar como alternativa o adicionalmente de los antígenos de *Chlamydia pneumoniae* enumerados en la Tabla 2. En una realización, uno o más de los uno o más antígenos adicionales se seleccionan de CT823, CT372, CT443, CT043, CT153, CT279, CT601, CT711, CT114, CT480, CT456, CT381, CT089, CT734 y CT016. Estos antígenos adicionales se enumeran en la Tabla 2 y sus secuencias se establecen en la sección de "Secuencias" que sigue a la Tabla 2.

55 En una realización, una OMV de la invención está combinada con CT089. En otra realización, una VME de la invención se combina con CT089 y CT381. Las combinaciones preferidas son una VME de la invención con uno o más antígenos seleccionados de CT372, CT443, CT601, CT153 y CT279. Otra combinación preferida incluye una VME de la

invención en combinación con 1, 2, o 3 de CT456, CT733 y/o CT043 (en particular, una combinación de los cuatro antígenos).

Preferentemente, CT823 es el antígeno heterólogo presentado por la OMV de la invención. Las combinaciones preferidas incluyen CT823+CT089; CT823+CT089+CT381; CT823 con uno o más antígenos seleccionados de CT372, CT443, CT601, CT153 y CT279 (por ejemplo CT823+CT372; CT823+CT443, CT823+CT601, CT823+CT153 y CT823+CT279); CT823 con 1,2 o 3 de CT456, CT733 y/o CT043 (por ejemplo, CT823+CT456; CT823+CT733; CT823+CT043 o más preferentemente, CT823+CT456+CT733+CT043).

Las combinaciones ventajosas de la invención son aquellas en las que dos o más antígenos actúan de manera sinérgica. Por lo tanto, la protección frente a *Chlamydia* lograda por su administración combinada supera la esperada por la mera adición de su eficacia protectora individual.

Los uno o más antígenos de *Chlamydia* adicionales pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) con 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con una secuencia presentada en la Tabla 2; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de una secuencia presentada en la Tabla 2, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estos uno o más antígenos de *Chlamydia* adicionales incluyen variantes de una secuencia presentada en la Tabla 2. Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de una secuencia presentada en la Tabla 2. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo N-terminal de una secuencia presentada en la Tabla 2, mientras conserva al menos un epítipo de una secuencia presentada en la Tabla 2. Otros fragmentos omiten uno o más dominios proteicos. Cuando un antígeno adicional de *Chlamydia* comprende una secuencia que no es idéntica a una secuencia completa de la Tabla 2 (por ejemplo, cuando comprende una secuencia con menos del 100 % de identidad de secuencia con la misma o cuando comprende un fragmento de la misma), se prefiere en cada caso individual que el antígeno de *Chlamydia* pueda generar un anticuerpo que reconoce una proteína que tiene la secuencia completa del antígeno de la Tabla 2 del que proviene.

TABLA 2

Número de referencia y anotaciones de <i>C. pneumoniae</i>	Número de referencia y anotaciones de <i>C. trachomatis</i>	Núm. de CT
	Proteína hipotética (AAC67968)	CT372
	omcB (AAC68042)	CT443
	Proteína hipotética (AAC67634)	CT043
	Proteína hipotética (AAC67744)	CT153
	Nqr3 (AAC67872)	CT279
	papQ (AAC68203)	CT601
	Proteína hipotética (AAC68306)	CT711
	Proteína hipotética (AAC67705)	CT114
	oppA_4 (AAC68080)	CT480
	Proteína hipotética (AAC68056)	CT456
	ArtJ (AAC67977)	CT381
	IcrE (AAC67680)	CT089
	Proteína hipotética (AAC68329)	CT734
	Proteína hipotética (AAC67606)	CT016

Número de referencia y anotaciones de <i>C. pneumoniae</i>	Número de referencia y anotaciones de <i>C. trachomatis</i>	Núm. de CT
gi 4376729 gb AAD18590.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376729 gb AAD18590.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376731 gb AAD18591.1 Familia G/1 de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376731 gb AAD18591.1 Familia G/1 de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329350 gb AAC68472.1 Posible proteína I de membrana externa	
gi 4376731 gb AAD18591.1 Familia G/1 de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376733 gb AAD18593.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3328840 gb AAC68009.11 Posible proteína A de membrana externa	
gi 4376731 gb AAD18591.1 Familia G/1 de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376754 gb AAD18611.1 Proteína de membrana externa polimórfica (desplazamiento del marco con C)	gi 3329344 gb AAC68467.1 Posible proteína E de membrana externa	
gi 4376260 gb AAD18163.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376262 gb AAD18165.1 proteína hipotética	gi 3328765 gb AAC67940.1 proteína hipotética	
gi 4376269 gb AAD18171.1 proteína hipotética	gi 3328825 gb AAC67995.1 proteína hipotética	
gi 4376270 gb AAD18172.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329350 gb AAC68472.1 Posible proteína I de membrana externa	
gi 4376272 gb AAD18173.1 PME predicha {péptido líder: membrana externa}	gi 3328772 gb AAC67946.1 proteína hipotética	CT351
gi 4376273 gb AAD18174.1 PME predicha {péptido líder}	gi 3328771 gb AAC67945.1 proteína hipotética	CT350
gi 4376296 gb AAD18195.1 proteína hipotética	gi 3328520 gb AAC67712.1 Ribulosa-P Epimerasa	
gi 4376362 gb AAD18254.1 proteína hipotética de la familia YbbP	gi 3328401 gb AAC67602.1 proteína hipotética	
gi 4376372 gb AAD18263.1 Peptidasa señal I	gi 3328410 gb AAC67610.1 Peptidasa señal I	
gi 4376397 gb AAD18286.1 proteína hipotética CHLPS	gi 3328506 gb AAC67700.1 proteína hipotética CHLPS	
gi 4376402 gb AAD18290.1 familia ACR	gi 3328505 gb AAC67699.1 familia ACR	
gi 4376419 gb AAD18305.1 proteína hipotética CT149	gi 3328551 gb AAC67740.1 posible hidrolasa	

Número de referencia y anotaciones de <i>C. pneumoniae</i>	Número de referencia y anotaciones de <i>C. trachomatis</i>	Núm. de CT
gi 4376446 gb AAD18330.1 proteína hipotética	gi 3329261 gb AAC68390.1 proteína hipotética	
gi 4376466 gb AAD18348.1 proteína de unión a oligopéptido	gi 3328604 gb AAC67790.1 proteína de unión a oligopéptido	CT198
gi 4376467 gb AAD18349.1 proteína de unión a oligopéptido	gi 3328604 gb AAC67790.1 proteína de unión a oligopéptido	
gi 4376468 gb AAD18350.1 proteína de unión a oligopéptido	gi 3328539 gb AAC67730.1 proteína de unión a oligopéptido	
gi 4376469 gb AAD18351.1 proteína de unión a oligopéptido	gi 3328579 gb AAC67766.1 proteína permeasa de unión a oligopéptido	
gi 4376520 gb AAD18398.1 Familia repetida de polisacárido hidrolasa-invasina	gi 3328526 gb AAC67718.1 Familia repetida de polisacárido hidrolasa-invasina predicha	
gi 4376567 gb AAD18441.1 proteína C de inclusión en membrana	gi 3328642 gb AAC67825.1 proteína C de inclusión en membrana	
gi 4376576 gb AAD18449.1 Análogo de Omp85	gi 3328651 gb AAC67834.1 Análogo de Omp85	CT241
gi 4376577 gb AAD18450.1 (Proteína de membrana externa de tipo OmpH)	gi 3328652 gb AAC67835.1 (Proteína de membrana externa de tipo OmpH)	CT242
gi 4376601 gb AAD18472.1 Respuesta D baja en calcio	gi 3328486 gb AAC67681.1 Respuesta D baja en calcio	
gi 4376602 gb AAD18473.1 Respuesta E baja en calcio	gi 3328485 gb AAC67680.1 Respuesta E baja en calcio	CT089
gi 4376607 gb AAD18478.1 Superfamilia de fosfolipasa D	gi 3328479 gb AAC67675.1 Superfamilia de fosfolipasa D {péptido líder (33)}	
gi 4376615 gb AAD18485.1 proteína hipotética YojL	gi 3328472 gb AAC67668.1 proteína hipotética	CT077
gi 4376624 gb AAD18493.1 Familia de unión de proteínas de soluto	gi 3328461 gb AAC67658.1 Familia de unión de proteínas de soluto	
gi 4376639 gb AAD18507.1 Proteína de secreción flagelar	gi 3328453 gb AAC67651.1 Proteína de secreción flagelar	
gi 4376664 gb AAD18529.1 Leucil aminopeptidasa A	gi 3328437 gb AAC67636.1 Leucil aminopeptidasa A	CT045
gi 4376672 gb AAD18537.1 Proteína de dominio CBS (Homólogo de hemolisina)	gi 3328667 gb AAC67849.1 Proteína hipotética que contiene dominios CBS	
gi 4376679 gb AAD18543.1 proteína hipotética CT253	gi 3328664 gb AAC67846.1 proteína hipotética	
gi 4376696 gb AAD18559.1 proteína hipotética CT266	gi 3328678 gb AAC67859.1 proteína hipotética	CT266
gi 4376717 gb AAD18579.1 Superfamilia de fosfolipasa D	gi 3328698 gb AAC67877.1 Superfamilia de fosfolipasa D	

Número de referencia y anotaciones de <i>C. pneumoniae</i>	Número de referencia y anotaciones de <i>C. trachomatis</i>	Núm. de CT
gi 4376727 gb AAD18588.1 Familia G/I de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376728 gb AAD18589.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376729 gb AAD18590.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329350 gb AAC68472.1 Posible proteína I de membrana externa	
gi 4376731 gb AAD18591.1 Familia G/I de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329350 gb AAC68472.1 Posible proteína I de membrana externa	
gi 4376733 gb AAD18593.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3328840 gb AAC68009.11 Posible proteína A de membrana externa	
gi 4376735 gb AAD18594.1 Fam A/I de proteínas de membrana externa polimórficas (truncadas)	gi 3328840 gb AAC68009.11 Posible proteína A de membrana externa	
gi 4376736 gb AAD18595.1 Familia G de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329346 gb AAC68469.1 Posible proteína G de membrana externa	
gi 4376737 gb AAD18596.1 Familia H de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329347 gb AAC68470.1 Posible proteína H de membrana externa	
gi 4376751 gb AAD18608.1 Familia E de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329344 gb AAC68467.1 Posible proteína E de membrana externa	
gi 4376752 gb AAD18609.1 Familia E de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329344 gb AAC68467.1 Posible proteína E de membrana externa	
gi 4376753 gb AAD18610.1 Familia E/F de proteínas de membrana externa polimórficas	gi 3329344 gb AAC68467.1 Posible proteína E de membrana externa	
gi 4376757 gb AAD18613.1 proteína hipotética	gi 3328701 gb AAC67880.1 superfamilia de ATPasa bucle PP	
gi 4376767 gb AAD18622.1 proteína periplásmica de unión a arginina	gi 3328806 gb AAC67977.1 proteína de unión a arginina	CT381
gi 4376790 gb AAD18643.1 proteína de choque térmico 70 (HSP-70)	gi 3328822 gb AAC67993.1 HSP-70	CT396
gi 4376802 gb AAD18654.1 proteína hipotética CT427	gi 3328857 gb AAC68024.1 proteína hipotética	
gi 4376814 gb AAD18665.1 proteína hipotética CT398	gi 3328825 gb AAC67995.1 proteína hipotética	CT398
gi 4376829 gb AAD18679.1 Familia A de proteínas de membrana polimórficas	gi 3328840 gb AAC68009.11 Posible proteína A de membrana externa	
gi 4376830 gb AAD18680.1 Familia B de proteínas de membrana polimórficas	gi 3328841 gb AAC68010.1 Posible proteína B de membrana externa	
gi 4376832 gb AAD18681.1 proteína de unión a soluto	gi 3328844 gb AAC68012.1 proteína de unión a soluto	CT415

Número de referencia y anotaciones de <i>C. pneumoniae</i>	Número de referencia y anotaciones de <i>C. trachomatis</i>	Núm. de CT
gi 4376834 gb AAD18683.1 (proteína de transporte de metales)	gi 3328846 gb AAC68014.1 (proteína de transporte de metales)	
gi 4376847 gb AAD18695.1 proteasa específica de cola	gi 3328872 gb AAC68040.1 proteasa específica de cola	
gi 4376848 gb AAD18696.1 proteína de 15 kDa rica en cisteína	gi 3328873 gb AAC68041.1 proteína de 15 kDa rica en cisteína	
gi 4376849 gb AAD18697.1 PME de 60 kDa rica en cisteína	gi 3328874 gb AAC68042.1 PME de 60 kDa rica en cisteína	CT443
gi 4376850 gb AAD18698.1 lipoproteína de 9 kDa rica en cisteína	gi 3328876 gb AAC68043.1 lipoproteína de 9 kDa rica en cisteína	CT444
gi 4376878 gb AAD18723.1 sensor de 2 componentes	gi 3328901 gb AAC68067.1 Sensor de sistema de histidina cinasa de 2 componentes de regulación	CT467
gi 4376879 gb AAD18724.1 similitud a CHLPS IncA	gi 3328451 gb AAC67649.1 proteína hipotética	
gi 4376884 gb AAD18729.1 proteína hipotética CT471	gi 3328905 gb AAC68071.1 proteína hipotética	
gi 4376886 gb AAD18731.1 familia YidD	gi 3328908 gb AAC68073.1 proteína hipotética	
gi 4376890 gb AAD18734.1 proteína hipotética CT476	gi 3328911 gb AAC68076.1 proteína hipotética	
gi 4376892 gb AAD18736.1 oligopéptido permeasa	gi 3328913 gb AAC68078.1 oligopéptido permeasa	
gi 4376894 gb AAD18738.1 lipoproteína de unión a oligopéptido	gi 3328915 gb AAC68080.1 lipoproteína de unión a oligopéptido	
gi 4376900 gb AAD18743.1 proteína de unión a glutamina	gi 3328922 gb AAC68086.1 proteína de unión a glutamina	
gi 4376909 gb AAD18752.1 Proteasa	gi 6578107 gb AAC68094.2 Proteasa	
gi 4376952 gb AAD18792.1 Apolipoproteína N-Acetiltransferasa	gi 3328972 gb AAC68136.1 Apolipoproteína N-Acetiltransferasa	
gi 4376960 gb AAD18800.1 peptidil-prolil cis-trans de tipo FKBP	gi 3328979 gb AAC68143.1 peptidil-prolil cis-trans de tipo FKBP	CT541
isomerasa	isomerasa	
gi 4376968 gb AAD18807.1 proteína hipotética CT547	gi 3328986 gb AAC68149.1 proteína hipotética	CT547
gi 4376969 gb AAD18808.1 proteína hipotética CT548	gi 3328987 gb AAC68150.1 proteína hipotética	
gi 4376998 gb AAD18834.1 Proteína principal de membrana externa	gi 3329133 gb AAC68276.1 Proteína principal de membrana externa	CT681

Número de referencia y anotaciones de <i>C. pneumoniae</i>	Número de referencia y anotaciones de <i>C. trachomatis</i>	Núm. de CT
gi 4377005 gb AAD18841.1 Proteína D de secreción YopC/Gen	gi 3329125 gb AAC68269.1 probable proteína de translocación de proteínas Yop	
gi 4377015 gb AAD18851.1 dominio FHA; (homología con la adenilato ciclasa)	gi 3329115 gb AAC68259.1 (dominio FHA; homología con la adenilato ciclasa)	
gi 4377033 gb AAD18867.1 Homolog_1 de CHLPN de 76 kDa (CT622)	gi 3329069 gb AAC68226.1 Homólogo de CHLPN de 76 kDa	CT622
gi 4377034 gb AAD18868.1 Homolog_2 de CHLPN de 76 kDa (CT623)	gi 6578109 gb AAC68227.2 Homólogo de CHLPN de 76 kDa	CT623
gi 4377035 gb AAD18869.1 proteína integral de membrana	gi 3329071 gb AAC68228.1 proteína integral de membrana	
gi 4377072 gb AAD18902.1 proteína hipotética CT648	gi 3329097 gb AAC68825.1 proteína hipotética	
gi 4377073 gb AAD18903.1 proteína hipotética CT647	gi 3329096 gb AAC68824.1 proteína hipotética	CT647
gi 4377085 gb AAD18914.1 proteína hipotética CT605	gi 3329050 gb AAC68208.1 proteína hipotética	
gi 4377090 gb AAD18919.1 Lipoproteína asociada a peptidoglicano	gi 3329044 gb AAC68202.1 Lipoproteína asociada a peptidoglicano	CT600
gi 4377091 gb AAD18920.1 transportador de macromoléculas	gi 3329043 gb AAC68201.1 componente de un sistema de transporte de macromoléculas	
gi 4377092 gb AAD18921.1 proteína hipotética CT598	gi 3329042 gb AAC68200.1 proteína hipotética	
gi 4377093 gb AAD18922.1 proteína de transporte de biopolímeros	gi 3329041 gb AAC68199.1 proteína de transporte de biopolímeros	CT597
gi 4377094 gb AAD18923.1 transportador de macromoléculas	gi 3329040 gb AAC68198.1 transportador de polisacáridos	
gi 4377101 gb AAD18929.1 proteína hipotética CT590	gi 3329033 gb AAC68192.1 proteína hipotética	
gi 4377102 gb AAD18930.1 proteína hipotética CT589	gi 3329032 gb AAC68191.1 proteína hipotética	CT589
gi 4377106 gb AAD18933.1 proteína hipotética	gi 3328796 gb AAC67968.1 proteína hipotética	
gi 4377111 gb AAD18938.1 Enolasa	gi 3329030 gb AAC68189.1 Enolasa	CT587
gi 4377127 gb AAD18953.1 Proteína de secreción general D	gi 3329013 gb AAC68174.1 Proteína de secreción general D Proteína D de Secreción	
gi 4377130 gb AAD18956.1 PME predicha {péptido líder}	gi 3329010 gb AAC68171.1 PME predicha	CT569

Número de referencia y anotaciones de <i>C. pneumoniae</i>	Número de referencia y anotaciones de <i>C. trachomatis</i>	Núm. de CT
gi 4377132 gb AAD18958.1 proteína hipotética CT567	gi 3329008 gb AAC68169.1 proteína hipotética	CT567
gi 4377133 gb AAD18959.1 proteína hipotética CT566	gi 3329007 gb AAC68168.1 proteína hipotética	
gi 4377140 gb AAD18965.1 J de translocación de Yop	gi 3329000 gb AAC68161.1 lipoproteína K de translocación de proteínas Yop	CT559
gi 4377170 gb AAD18992.1 proteína B de membrana externa	gi 3329169 gb AAC68308.1 análogo de proteína de membrana externa	CT713
gi 4377177 gb AAD18998.1 Proteína de anillo M flagelar	gi 3329175 gb AAC68314.1 Proteína de anillo M flagelar	
gi 4377182 gb AAD19003.1 proteína hipotética CT724	gi 3329181 gb AAC68319.1 proteína hipotética	
gi 4377184 gb AAD19005.1 proteína en forma de barra	gi 3329183 gb AAC68321.1 proteína en forma de barra	
gi 4377193 gb AAD19013.1 proteína hipotética CT734	gi 3329192 gb AAC68329.1 proteína hipotética	
gi 4377206 gb AAD19025.1 posible fosfoproteína CHLTR	gi 3329204 gb AAC68339.1 posible fosfoproteína CHLTR	
gi 4377222 gb AAD19040.1 Muramidasa (familia de repetición de invasina)	gi 3329221 gb AAC68354.1 Muramidasa (familia de repetición de invasina)	CT759
gi 4377223 gb AAD19041.1 Proteína de división celular FtsW	gi 3329222 gb AAC68355.1 Proteína de división celular FtsW	
gi 4377224 gb AAD19042.1 peptidoglicano transferasa	gi 3329223 gb AAC68356.1 peptidoglicano transferasa	CT761
gi 4377225 gb AAD19043.1 Muramato-Ala Ligasa y D-Ala-D-Ala Ligasa	gi 3329224 gb AAC68357.1 UDP-N-acetilmuramato-alanina ligasa	
gi 4377248 gb AAD19064.1 Tiorredoxina Disulfuro Isomerasa	gi 3329244 gb AAC68375.1 Tiorredoxina Disulfuro Isomerasa	
gi 4377261 gb AAD19076.1 CT788 proteína hipotética - {péptido líder-periplasma	gi 3329253 gb AAC68383.1 {péptido líder (60)-periplásmica}	
gi 4377280 gb AAD19093.1 familia insulinasas/Proteasa III	gi 3329273 gb AAC68402.1 familia insulinasas/Proteasa III	
gi 4377287 gb AAD19099.1 Posible familia de proteína D de membrana externa	gi 3329279 gb AAC68408.1 Posible proteína D de membrana externa	
gi 4377306 gb AAD19116.1 DO serina proteasa	gi 3329293 gb AAC68420.1 DO serina proteasa	CT823
gi 4377342 gb AAD19149.1 permeasa de transporte ABC	gi 3329327 gb AAC68451.1 Permeasa de transportador ABC -proteína de biosíntesis de pirimidina	

Número de referencia y anotaciones de <i>C. pneumoniae</i>	Número de referencia y anotaciones de <i>C. trachomatis</i>	Núm. de CT
gi 4377347 gb AAD19153.1 proteína hipotética CT858	gi 6578118 gb AAC68456.2 Proteasa predicha que contiene los dominios IRBP y DHR	
gi 4377353 gb AAD19159.1 proteína hipotética CT863	gi 3329337 gb AAC68461.1 proteína hipotética	
gi 4377367 gb AAD19171.1 PME predicha	gi 3328795 gb AAC67967.1 proteína hipotética	
gi 4377408 gb AAD19209.1 proteína hipotética	gi 3328795 gb AAC67967.1 proteína hipotética	
gi 4377409 gb AAD19210.1 Proteína predicha de membrana externa (CT371)	gi 3328795 gb AAC67967.1 proteína hipotética	
gi 143764111 gb 1	gi 3328512 gb AAC67705.1 proteína hipotética	CT114
gi 4376508 gb	gi 3328585 gb AAC67772.1 proteína hipotética	CT181
gi 4376710 gb	gi 3328692 gb AAC67872.1 NADH (Ubiquinona) Oxidorreductasa, Gamma	CT279
gi 4376777 gb	gi 3328815 gb AAC67986.1 proteína hipotética	CT389
gi 4376782 gb	gi 3328817 gb AAC67988.1 proteína hipotética	CT391
gi 4376863 gb	gi 3328887 gb AAC68054.1 Arginil ARNt transferasa	CT454
gi 4376866 gb	gi 3328889 gb AAC68056.1 proteína hipotética	CT456
gi 4376972 gb	gi 3328991 gb AAC68153.1 D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa	CT551
gi 4377139 gb	gi 3329001 gb AAC68162.1 proteína hipotética	CT560
gi 4377154 gb	gi 3329154 gb AAC68295.1 proteína hipotética	CT700
gi 4377191 gb AAD19012.1 proteína hipotética	gi 3329191 gb AAC68328.1 proteína hipotética	CT733

Como también se describe en la presente memoria, los antígenos de *Chlamydia* adicionales usados pueden estar presentes en la composición como polipéptidos individuales separados. Como alternativa, la combinación puede estar presente como un polipéptido híbrido en el que dos o más (es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más) de los antígenos se expresan como una cadena individual de polipéptidos. Los polipéptidos híbridos ofrecen dos ventajas principales: primera, un polipéptido que puede ser inestable o que esté mal expresado puede ser asistido mediante la adición de un compañero híbrido adecuado que solucione el problema; segunda, la fabricación comercial se simplifica de manera que solo se necesita emplear una expresión y purificación para producir dos polipéptidos que sean ambos antigénicamente útiles. Los diferentes polipéptidos híbridos se pueden mezclar juntos en una única formulación. En estas combinaciones, un antígeno de *Chlamydia trachomatis* puede estar presente en más de un polipéptido híbrido y/o como un polipéptido no híbrido. Alternativamente, un antígeno puede estar presente bien como un híbrido o bien como un no híbrido, pero no como ambos.

Los polipéptidos híbridos se pueden representar mediante la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L-}\}_n\text{-B-COOH}$, en la que: al menos una X es una secuencia de aminoácidos de un antígeno heterólogo tal como se describe anteriormente; L es una secuencia opcional de aminoácidos de enlace; A es una secuencia opcional de aminoácidos de extremo N-terminal; B es una secuencia opcional de aminoácidos de extremo C-terminal; n es un número entero de 2 o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, etc.). Normalmente n es 2 o 3.

Si un resto -X- tiene una secuencia líder de péptidos en su forma silvestre, esta se puede incluir o suprimir en la proteína híbrida. Los péptidos líder se eliminarán excepto por el del resto -X- localizado en el extremo N-terminal de la proteína híbrida, es decir, el péptido líder de X_1 será retenido, pero los péptidos líder de $X_2 \dots X_n$ se suprimirán. Esto es equivalente a eliminar todos los péptidos líder y usar el péptido líder de X_1 como resto -A-.

- 5 Para cada uno de los n casos de $\{-X-L-\}$, la secuencia de aminoácidos de enlace -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n=2$ el híbrido puede ser $NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH$, etc. La(s) secuencia(s) de aminoácidos enlazadora(s) -L- típicamente será(n) corta(s) (por ejemplo, de 20 aminoácidos o menos, es decir, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos comprenden secuencias de péptidos cortos que facilitan la clonación, enlazadores de poliglicina (es decir, que comprenden Gly_n cuando $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), y marcadores de histidina (es decir, His_n cuando $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos enlazadoras serán evidentes para los expertos en la materia. Un enlazador útil es GSGGGG (SEQ ID NÚM.: 65), estando formado el dipéptido Gly-Ser a partir de un sitio de restricción *BamHI*, ayudando así a la clonación y a la manipulación, y siendo el tetrapéptido $(Gly)_4$ un típico enlazador de poliglicina.
- 10
- 15 - A- es una secuencia opcional de aminoácidos de N-terminal. Esta será típicamente corta (por ejemplo, 40 aminoácidos o menos, es decir, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas o secuencias peptídicas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo, marcadores de histidina, es decir, His_n en la que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias adecuadas de aminoácidos de N-terminal serán evidentes para los expertos en la materia. Si X_1 carece de su propia metionina del extremo N-terminal, -A- es preferentemente un oligopéptido (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) que proporciona una metionina del extremo N-terminal.
- 20
- 25 - B es una secuencia opcional de aminoácidos de C-terminal. Ésta será típicamente corta (por ejemplo, 40 aminoácidos o menos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo, que comprenden marcadores de histidina, es decir, His_n en la que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), o secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína. Otras secuencias adecuadas de aminoácidos de C-terminal serán evidentes para los expertos en la materia.
- 30 Cuando se usan polipéptidos híbridos, los antígenos individuales en el híbrido (es decir, los restos -X- individuales) pueden ser de una o más cepas. Cuando $n=2$, por ejemplo, X_2 puede ser de la misma cepa que X_1 o de una cepa diferente. Cuando $n=3$, las cepas pueden ser (i) $X_1=X_2=X_3$ (ii) $X_1=X_2 \neq X_3$ (iii) $X_1 \neq X_2=X_3$ (iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ o (v) $X_1=X_3 \neq X_2$, etc.

35 También se describe en la presente memoria un kit que comprende una OMV de la invención y uno o más antígenos adicionales para administración simultánea, separada o secuencial.

El antígeno heterólogo puede estar presente mediante cualquier procedimiento adecuado. En algunas realizaciones, la secuencia codificante del antígeno heterólogo se fusiona con una secuencia peptídica líder, por ejemplo, la secuencia peptídica líder de OmpA, y la fusión se pone bajo el control de un promotor en un plásmido. El promotor lac es un ejemplo de un promotor adecuado. Se puede usar cualquier plásmido adecuado, por ejemplo, el plásmido multicopia pET. Tal como se ha mencionado anteriormente, el antígeno heterólogo se puede presentar en el contexto de una secuencia de polipéptidos más larga, por ejemplo, con una secuencia adicional de N-terminal y/o C-terminal para el antígeno heterólogo. En tales casos, los péptidos líder se fusionarán a la secuencia peptídica más larga.

40

El plásmido derivado puede usarse para transformar la bacteria y los clones recombinantes se cultivan en cultivos líquidos. Las VME liberadas se pueden purificar mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, centrifugación.

45

Anticuerpos

El antígeno heterólogo preferentemente induce anticuerpos capaces de neutralizar la infección o la virulencia del patógeno del que proviene el antígeno. Como también se describen en la presente memoria, estos anticuerpos neutralizantes se pueden usar como una vacuna capaz de neutralizar la infección o la virulencia del patógeno, por ejemplo, de *Chlamydia*, más en particular, de *C. trachomatis* o *C. pneumoniae*.

50

También se describen en la presente memoria uno o más anticuerpos que se unen a un antígeno heterólogo presentado por una OMV de la invención. El anticuerpo puede no unirse al antígeno heterólogo cuando no está presente en una OMV descrita en la presente memoria. Por ejemplo, el anticuerpo puede no unirse al antígeno heterólogo en su forma purificada. El anticuerpo puede unirse a un epítipo que está inmunoaccesible y en su conformación natural cuando el antígeno heterólogo está presente en una OMV de la invención pero que no está inmunoaccesible y/o no en su conformación natural cuando está presente por el antígeno en su forma purificada. Por ejemplo, los presentes inventores han descubierto que se reconocen diferentes epítipos en TC0210 cuando se presenta por una VME de la invención que cuando se presenta en su forma purificada (véanse los resultados del

55

Ejemplo 8). Por lo tanto, como también se describe en la presente memoria, se proporciona una OMV, composición o vacuna para uso en la generación de anticuerpos que se unen a uno o más epitopos en el antígeno heterólogo que no están inmunoaccesibles cuando el antígeno heterólogo se administra en una forma purificada.

El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como también sus fragmentos que son capaces de unirse a un antígeno. Éstas incluyen moléculas de anticuerpo híbridas (quiméricas) ([27], [28]); fragmentos F(ab')₂ y F(ab) y moléculas de Fv; heterodímeros no covalentes ([29]; [30]); moléculas de Fv de cadena simple (sFv) [31]; construcciones de fragmentos de anticuerpos dimericos o triméricos; minicuerpos [32],[33]; moléculas de anticuerpo humanizadas [34], [35], [36]; y cualquiera de los fragmentos funcionales obtenido de tales moléculas, así como anticuerpos obtenidos mediante procesos no convencionales tales como la expresión en fago. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. Los procedimientos de obtención de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la materia. Los anticuerpos humanizados o los completamente humanos son los preferidos.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y se pueden producir mediante cualquier medio adecuado. El anticuerpo puede incluir un marcador detectable.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para preparar anticuerpos que comprende inmunizar a un mamífero (tal como un ratón o un conejo) con una OMV de la invención y obtener anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, el antisero policlonal se puede obtener mediante el sangrado de animales inmunizados en un recipiente de cristal o de plástico, la incubación de la sangre a 25 °C durante una hora, seguida de la incubación a 4 °C durante 2-18 horas. El suero se recupera mediante centrifugación (por ejemplo, 1.000g durante 10 minutos). Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el procedimiento habitual de Kohler y Milstein [37], o una modificación del mismo, o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. También se describe una preparación de anticuerpo policlonal preparado mediante este procedimiento.

Los títulos y las especificidades de los anticuerpos se pueden medir usando procedimientos habituales disponibles en la técnica. Otros procedimientos para ensayar la inmunogenicidad de proteínas también son bien conocidos en la materia.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden usar en combinación con uno o más anticuerpos específicos para uno o más antígenos adicionales (por ejemplo, antígenos de *Chlamydia*) para su uso en el diagnóstico de infecciones (por ejemplo, infecciones de *Chlamydia*).

Composiciones inmunogénicas y medicamentos

La OMV, el medicamento o la bacteria puede estar en la forma de una composición. Estas composiciones pueden ser adecuadas como composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas), o como reactivos de diagnóstico. Generalmente, la composición comprenderá múltiples copias de la misma VME o bacteria.

Es particularmente ventajoso usar una OMV de la invención en una composición inmunogénica tal como una vacuna. Preferentemente, la formulación final de la vacuna es más estable en comparación con las composiciones inmunogénicas que comprenden el antígeno heterólogo en la forma purificada.

También se describen en la presente memoria composiciones inmunogénicas que comprenden una o más bacterias descritas en la presente memoria. La bacteria puede ser una bacteria no patógena. En tales realizaciones, las OMV se generan *in vivo*.

Una composición inmunogénica de la invención comprende una OMV de acuerdo con la invención. Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención pueden bien ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas. Cuando la composición inmunogénica es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño que está aprendiendo a andar o un lactante) o un adolescente; cuando la composición inmunogénica es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una composición inmunogénica destinada a los niños también se puede administrar a los adultos, por ejemplo, para evaluar su seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

La composición inmunogénica puede ser para el tratamiento o la prevención de infección por *Chlamydia* o una afección asociada (por ejemplo, tracoma, ceguera, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad, embarazo ectópico, dolor pélvico crónico, salpingitis, uretritis, epididimitis, neumonía infantil, pacientes infectados por carcinoma de células escamosas de cuello uterino, y/o infección por VIH, etc.), por ej., infección por *C. trachomatis*. La composición inmunogénica puede ser eficaz frente a *C. pneumoniae*.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de la OMV de la invención, así como cualesquier otros componentes, según lo requerido. El término "cantidad inmunológicamente eficaz" significa que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condiciones físicas del individuo a tratar, de la edad, del grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por

ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación del médico a cargo del tratamiento de la situación médica, y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un rango relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos habituales. Cuando se incluye más de un antígeno en una composición, los dos antígenos pueden estar presentes a la misma dosis entre sí o a diferentes dosis.

En general, una composición de la invención comprenderá un antígeno heterólogo a una concentración que será suficiente para generar una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno. Los antígenos heterólogos en la composición típicamente estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una dosis de una composición de la invención comprende de 1 a 600 µg del antígeno heterólogo, por ejemplo, 1 a 500 µg, 100-500 µg, 100-200 µg, 1 a 300 µg, 1 a 100 µg, 1 a 50 µg, 1 a 35 µg, 1 a 25 µg, 10 a 30 µg, 20 a 30 µg, 23 a 27 µg o 24 a 26 µg de antígeno heterólogo. Preferentemente, una dosis de una composición de la presente invención comprende 25 µg del antígeno heterólogo. Estas preferencias de la dosis se pueden aplicar a los procedimientos de la invención haciendo los cambios necesarios.

El tratamiento de dosis puede ser un cronograma de una única dosis o un cronograma de múltiple dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta de dosificación múltiple, las diversas dosis se pueden dar por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo, una primera dosis por vía parenteral y un refuerzo por vía mucosal, una primera dosis por vía mucosal y un refuerzo por vía parenteral, etc. Las múltiples dosis se administrarán típicamente con al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

El pH de una composición generalmente estará entre 5,0 y 8,1 y más típicamente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5 o entre 7,0 y 7,8, preferentemente aproximadamente 7. El pH se puede mantener mediante el uso de un tampón.

La composición es preferentemente estéril. La composición preferentemente no es pirogénica, por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medición estándar) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición es preferentemente sin gluten. La composición puede ser isotónica con respecto a los seres humanos.

Las composiciones inmunogénicas de la invención se administrarán generalmente de forma directa al paciente. La administración directa se puede lograr mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, o al espacio intersticial de un tejido), o por vía mucosal, tal como mediante administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverizador), vaginal, tópica, transdérmica (véase, por ejemplo, [38]) o transcutánea (véase, por ejemplo, [39] y [40]), intranasal (véase, por ejemplo [41]), ocular, ótica, pulmonar u otra administración mucosal.

Las infecciones por patógenos (tal como infecciones por *Chlamydia*) afectan diversas áreas del cuerpo y, por lo tanto, las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones líquidas o bien como suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada o una composición secada por pulverización en frío). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. La composición se puede preparar para la administración oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para la administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un pulverizador. La composición se puede preparar como un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para la administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo, como gotas.

También se describe en la presente un dispositivo de administración previamente llenado con una composición inmunogénica de la invención.

También se describe en la presente memoria un kit que comprende un primer componente y un segundo componente en el que ni el primer componente ni el segundo componente son una composición de la invención tal como se describe en la presente memoria, pero en el que el primer componente y el segundo componente se pueden combinar para proporcionar una composición de la invención tal como se describe en la presente memoria. El kit puede incluir adicionalmente un tercer componente que comprende uno o más de los siguientes: instrucciones, jeringas u otro dispositivo de administración, adyuvante o solución de formulación farmacéuticamente aceptable.

La composición puede estar en forma de kit, diseñada de tal forma que una composición combinada se reconstituya exactamente antes de la administración a un paciente. Tales kits pueden comprender uno o más VME en forma líquida y uno o más agentes liofilizados.

Cuando una composición se prepara de manera extemporánea antes de su uso (por ejemplo, cuando un componente está presente en forma liofilizada) y está presente como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa rellena y lista y un vial, usando los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

Por lo tanto, las composiciones pueden ser aceptables para uso farmacéutico. Normalmente incluirán componentes además de las VME, por ejemplo, típicamente incluirán uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos. Una discusión completa de dichos componentes está disponible en la referencia 166.

5 Las composiciones se administrarán generalmente a un mamífero en forma acuosa. Antes de la administración, sin embargo, la composición puede haber estado en una forma no acuosa. Por ejemplo, aunque algunas vacunas se han fabricado en forma acuosa, después se rellenan y se distribuyen y se administran también en forma acuosa, otras vacunas se liofilizan durante la fabricación y se reconstituyen en una forma acuosa en el momento de su uso. Por lo tanto, una composición descrita en la presente memoria puede estar seca, tal como una formulación liofilizada.

10 La composición puede incluir conservantes tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, es preferente que la vacuna esté sustancialmente libre de (es decir, menos de 5 µg/ml) material de mercurio, por ejemplo, libre de tiomersal. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas. Las vacunas sin conservantes son particularmente preferidas.

15 Para controlar la tonicidad, es preferente incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Es preferente cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml, por ejemplo entre 10±2 mg/ml de NaCl. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato potásico, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

Las composiciones generalmente tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, que más preferentemente estará en el intervalo de 290-310 mOsm/kg.

20 Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (en particular con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Se incluirán normalmente tampones en el intervalo de 5-20 mM.

25 La composición puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit 'multidosis'). La inclusión de un conservante se prefiere en disposiciones multidosis. Como alternativa (o adicionalmente) a la inclusión de un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la eliminación del material.

Las vacunas humanas se administran típicamente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque se puede administrar media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a los niños.

30 Las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria también pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. Preferentemente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen uno o más adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2, tratados en detalle a continuación.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de: (1) una VME de la invención; y (2) un adyuvante, tal como un adyuvante de hidróxido de aluminio (por ejemplo, uno o más antígenos pueden estar adsorbidos a hidróxido de aluminio).

Los adyuvantes que se pueden usar en las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación:

35 **A. Composiciones que contienen minerales**

40 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tal como sales de aluminio y sales de calcio (o sus mezclas). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "CAP" desveladas en la ref. 42). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., con las sales adoptando cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). Es preferente la adsorción a estas sales (por ejemplo, todos los antígenos pueden estar adsorbidos). Las composiciones que contienen minerales también se pueden formular como una partícula de sal de metal [43].

45 Se pueden usar los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan sólo por conveniencia, ya que ninguno de los dos es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 48). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se usan en general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente sales de hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo contienen también una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Se pueden obtener mediante precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal.

50 Una morfología fibrosa (por ejemplo, tal como se observa en micrografías electrónicas de transmisión) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pI de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es normalmente de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico.

Se han informado capacidades de adsorción entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes de fosfato de aluminio tienen generalmente una relación molar PO_4/Al de entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar de POVAI entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio será generalmente particulado (por ejemplo, morfología similar a placas como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción del antígeno. Las capacidades adsorptivas de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 se han documentado para los adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción utilizadas para preparar la sal mediante precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = más PZC ácido) o añadiendo un tampón, tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5 por ejemplo, aproximadamente 5,7.

La adsorción de los antígenos de la proteína de *S. aureus* (excepto IldA, Sta019 y Sta073) a un adyuvante de hidróxido de aluminio es ventajosa, particularmente en una combinación de múltiples proteína (en la que todos los antígenos se pueden adsorber). Un tampón de histidina puede estar incluido de forma útil en tales composiciones con adyuvante.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón fosfato o de histidina o Tris), pero esto no es siempre necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y sin pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes a una concentración de entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro sódico.

La invención puede usar una mezcla de un hidróxido de aluminio y un fosfato de aluminio. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, en una relación en peso de al menos 2:1, por ejemplo, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

La concentración de Al^{+++} en una composición para su administración a un paciente es preferentemente menor que 10 mg/ml, por ejemplo, ≤ 5 mg/ml, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, etc. Un intervalo preferente es entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0,85 mg/dosis.

B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tal como MF59 [Capítulo 10 de la ref. 48; véase también la ref. 44] (escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 %, y Span 85 al 0,5 %, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). El adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) también se pueden usar.

Son conocidos diversos adyuvantes de emulsiones de aceite en agua, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, con los aceites y tensioactivos siendo biodegradables (que se pueden metabolizar) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión son generalmente menores de 5 μm de diámetro, e idealmente tener un diámetro submicrométrico, alcanzando estos tamaños pequeños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Las gotas con un tamaño menor de 220 nm son preferidas dado que se pueden someter a esterilización por filtrado.

La emulsión puede comprender aceites tal como los de una fuente animal (tal como peces) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de algodón o aceite de oliva, el más comúnmente disponible, ejemplifican los aceites de frutos secos. Se puede usar aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido a partir de la jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de sésamo y similares. En el grupo de los cereales, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero el aceite de otros cereales tales como el trigo, la avena, el centeno, el arroz, el teff, el triticale y similares también se pueden usar. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se dan de manera natural en aceites de semilla, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados comenzando a partir de los aceites de frutos secos y semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero se pueden metabolizar y, por tanto, se pueden usar en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros a partir de fuentes animales son bien conocidos en la materia. La mayoría de animales marinos contienen aceites que se pueden metabolizar que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón, y los aceites de ballena tales como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de animales marinos que se pueden usar en el presente documento. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan de manera bioquímica en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan de manera general terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado e

insaturado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, es también un aceite preferido. Los aceites de animales marinos, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles a partir de fuentes comerciales o se pueden obtener mediante procedimientos conocidos en la materia. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase a continuación). Se pueden usar mezclas de aceites.

Los tensioactivos se pueden clasificar por su "HLB" (equilibrio hidrófilo-lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 16. La invención se puede usar con tensioactivos que incluyen, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietilen sorbitán (comúnmente denominados Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), comercializados bajo el nombre comercial de DOWFAX™, tal como copolímeros de bloque EO / PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de repeticiones de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo), con octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) siendo de interés particular; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tal como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilados de nonilfenol, tal como la serie NP de Tergitol™; éteres grasos de polioxietileno que provienen de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tal como el trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como SPAN), tal como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para incluirlos en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de polioxietilen sorbitán tal como monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) es también adecuada. Otra combinación útil comprende laureth 9 y más un éster de polioxietilen sorbitán y/o un octoxinol.

Las cantidades preferentes de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietilen sorbitán (tal como Tween 80) de 0,01 al 1 %, en particular, aproximadamente el 0,1 %; octil- o nonilfenoxietanoles (tal como Triton X-100 u otros detergentes de la serie Triton) del 0,001 al 0,1 %, en particular, del 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tal como laureth 9) del 0,1 al 20 %, preferentemente del 0,1 al 10 % y en particular, del 0,1 al 1 % o aproximadamente el 0,5 %.

Los adyuvantes de emulsión preferentes tienen un tamaño de gota promedio de <1 µm, por ejemplo, ≤750 nm, ≤500 nm, ≤400 nm, ≤300 nm, ≤250 nm, ≤220 nm, ≤200 nm, o más pequeño. Estos tamaños de gota se pueden lograr convenientemente mediante técnicas tales como la microfluidización.

Los adyuvantes específicos de emulsión de aceite en agua útiles para la invención incluyen, pero sin limitación:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas proporciones llegan a ser del 4,3 % de escualeno, el 0,5 % de polisorbato 80 y el 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [45-47], tal como se describe en más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 48 y en el capítulo 12 de la ref. 49. La emulsión MF59 ventajosamente incluye iones de citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y polisorbato 80 (Tween 80). La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener desde el 2 hasta el 10 % de escualeno, desde el 2 hasta el 10 % de tocoferol y desde el 0,3 hasta el 3 % de Tween 80, y la proporción de peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤1 dado que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en una proporción de volumen de aproximadamente 5:2 o en una proporción de peso de aproximadamente 11:5. Una emulsión así se puede preparar disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución del 2 %, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de 5 g de DL-α-tocoferol y 5 ml de escualeno, después microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas submicrométricas de aceite, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm. La emulsión también puede incluir un monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5-11 mg de tocoferol y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [50].

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión puede contener un tampón fosfato.

- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α-tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 µg/ml de polisorbato 80, 110 µg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de succinato de α-tocoferol), y estas concentraciones deben de incluir cualquier contribución de estos componentes a partir de los antígenos. La emulsión también

puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.

- Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para péptidos de muramilo, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [51] (0,05-1 % de Thr-MDP, el 5 % de escualano, el 2,5 % de Pluronic L121 y el 0,2 % de polisorbato 80). También se puede usar sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" (52) (5 % de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y el 0,2 % de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.

- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de polioxitileno alquiléter (por ejemplo, polioxitileno (12) cetoesteariléter) y un tensioactivo no iónico hidrofóbico (por ejemplo, un éster de sorbitán o un éster de manida, tal como monoleato de sorbitán o "Span 80"). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos el 90 % de las gotas de aceite (en volumen) con un tamaño menor de 200 nm [53]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecil maltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglucósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [54]. Tales emulsiones se pueden liofilizar.

- Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [55]. La concentración final (peso) de estos componentes en vacunas con adyuvante es del 5 % de escualeno, el 4 % de poloxámero 105 (poliol plurónico) y el 2 % de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).

- Una emulsión que tiene desde el 0,5-50 % de un aceite, el 0,1-10 % de un fosfolípido y el 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Tal como se describe en la referencia 56, los componentes de fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gota submicrométricos son ventajosos.

- Una emulsión de aceite en agua de un aceite que no se puede metabolizar (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tal como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 57, producido mediante la adición de una amina alifática la desacilsaponina mediante el grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetiiodioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.

- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroide (por ejemplo, un colesterol) se asocian como micelas helicoidales [58].

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso no iónico, lipofílico y etoxilado y un tensioactivo no iónico hidrofílico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloques de polioxitileno-polioxiopropileno) [59].

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso no iónico, hidrófilo y etoxilado, y un tensioactivo no iónico lipófilo (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloques de polioxitileno-polioxiopropileno) [59].

En algunas realizaciones, una emulsión se puede mezclar con antígeno de manera extemporánea, al momento de la administración y, por lo tanto, el adyuvante y el antígeno se pueden mantener por separado en una vacuna empacada o distribuida, lista para la formulación final en el momento de su uso. En otras realizaciones, una emulsión se mezcla con antígeno durante la fabricación, y por lo tanto, la composición se envasa en una forma líquida con adyuvante. El antígeno estará de manera general en una forma acuosa, de manera que la vacuna se prepare finalmente mezclando dos líquidos. La proporción en volumen de los dos líquidos para la mezcla puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero está generalmente sobre 1:1. Cuando las concentraciones de los componentes se dan en las descripciones anteriores de emulsiones específicas, estas concentraciones son típicamente para una composición no diluida y la concentración tras la mezcla con una solución de antígeno, por lo tanto, disminuirá.

Cuando una composición incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero son preferentes los α -tocóferoles. El tocoferol puede adoptar varias formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Se puede usar tanto D- α -tocóferol como DL- α -tocóferol. Los tocoferoles se incluyen de manera ventajosa en las vacunas para uso en pacientes ancianos (por ejemplo, de 60 años de edad o mayores) dado que se ha documentado que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria en este grupo de pacientes [60]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [61]. Un α -tocóferol preferido es DL- α -tocóferol, y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. Se ha descubierto que la sal de succinato coopera con los ligandos relacionados con TNF *in vivo*.

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 481]

Las formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterogéneo de glucósidos de esteroide y glucósidos de triterpenoides que se encuentran en la corteza, en las

hojas, en los tallos, en las raíces e incluso en las flores de un rango amplio de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officianalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOMs. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones específicas purificadas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 62. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroide, tal como colesterol [63].

Las combinaciones de saponinas y colesterol se pueden usar para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 48]. Los ISCOM típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida se puede usar en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las refs. 63-65. Opcionalmente, los ISCOM se pueden estar desprovistos de detergente adicional [66].

Una revisión del desarrollo de los adyuvantes basados en saponinas se puede encontrar en las referencias. 67 y 68.

D. Virosomas y partículas de tipo virus

Los virosomas y partículas de tipo virus (VLP) también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. De manera general, son no patógenos, replicantes, y generalmente no contienen ninguno del genoma vírico natural. Las proteínas víricas se pueden producir de manera recombinante o aislar de los virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), del virus de la hepatitis B (tal como las proteínas del núcleo o de la cápside), del virus de la hepatitis E, del virus del sarampión, del virus Sindbis, del rotavirus, del virus de la enfermedad de fiebre aftosa, del retrovirus, del Virus de Norwalk, del virus del papiloma humano, del VIH, de los fagos de ARN, del fago Q β (tal como proteínas de revestimiento), del fago GA, del fago fr, del fago AP205 y de Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty).. Las VLP se discuten con más detalle en las referencias. 69-74. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, la ref. 75.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tal como derivados no tóxicos de lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS), derivados de lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ADP-ribosilantes y derivados detoxificados de las mismas.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-deacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 de-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma de "pequeña partícula" preferida de monofosforil lípido A 3 De-O-acilado se desvela en la ref. 76. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para esterilizarlas por filtración a través de una membrana de 0,22 μ m [76]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tal como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato, por ejemplo, RC-529 [77,78].

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tal como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en las refs. 79 y 80.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contienen una citosina no metilada enlazada mediante una unión de fosfato a una guanina). Los ARN de cadena doble y los nucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también han demostrado ser inmunoestimuladores.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tal como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o de cadena individual. Las referencias 81, 82 y 83 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo sustitución de guanina con 2'-desoxi-7-deazaguanina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en las refs. 84-89.

Se puede dirigir la secuencia CpG a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [90]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN de CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN CdG-B. Los ODN de CpG-A y CpG-B se discuten en las referencias. 91-93. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, se pueden unir dos secuencias de oligonucleótidos CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las refs. 90-94, 96.

Un adyuvante útil de CpG es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Otro es CpG1826. Como alternativa o adicionalmente, para usar secuencias CpG, se pueden usar las secuencias TpG [97], y estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados. El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo TTTT, tal como se desvela en la ref. 97), y/o puede tener una composición de nucleótidos con > 25 % en timidina (por ejemplo, > 35%, > 40%, > 50%, > 60%, > 80%, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo CCCC, tal como se desvela en la ref. 97), y/o puede tener una composición de nucleótidos con > 25 % en citosina (por ejemplo, > 35%, > 40%, > 50%, > 60%, > 80%, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán típicamente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

Un adyuvante particularmente útil con base en oligonucleótidos inmunoestimuladores, se conoce como IC-31™ [98]. Por lo tanto, un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) que incluye al menos un (y preferentemente, múltiples) motivo Cpl (es decir, una citosina enlazada a una inosina para formar un dinucleótido) y (II) un polímero policationico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) que incluye al menos una (y preferentemente múltiples) secuencias de tripéptido Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende una secuencia de 26-mero 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO: 66). El polímero policationico puede ser un péptido que comprende una secuencia 11-mera de aminoácidos KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 67). El oligonucleótido y el polímero pueden formar complejos, por ejemplo, tal como se desvela en las referencias 99 y 100.

Las toxinas ribosilantes de ADP bacteriano y los derivados detoxificados de las mismas se pueden usar como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína proviene de *E. coli* (enterotoxina de *E. coli* lábil al calor, "LT"), del cólera ("CT") o de pertussis ("PT"). El uso de las toxinas ADP-ribosilantes detoxificadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 101 y como adyuvantes parenterales en la referencia 102. La toxina o el toxoide está preferentemente en la forma de una holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferentemente, la subunidad B no está mutada. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación para detoxificación; preferentemente, la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosiladas y sus derivados detoxificados, en particular LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las referencias. 103-110. Un mutante de CT útil es CT-E29H [111]. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas ADP-ribosilantes expuestas en la ref. 112.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tal como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [113], etc.) [114], interferones (por ejemplo, interferón-γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferido es IL-12.

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [115] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de ácido poli(acrílico), alcohol de polivinilo, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y los derivados del mismo también se pueden usar como adyuvantes en la invención [116].

H. Micropartículas

Las micropartículas también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 μm de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 μm de diámetro, y lo más preferentemente de ~500 nm a ~10 μm de diámetro) formada a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(láctido-co-glicólido) son preferentes, opcionalmente tratados para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 48)

Los ejemplos de las formulaciones de liposoma adecuadas para uso como adyuvantes se describen en las referencias 117-119.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y de éster de polioxietileno

- 5 Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [120]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol [121] así como polioxietileno alquil éteres o tensioactivos de éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [122]. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilen-9 esteroil éter, polioxietilen-8-esteroil éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter, y polioxietilen-23-lauril éter.

K. Fosfacenos

Se puede usar un fosfaceno, tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] ("PCPP") tal como se describe, por ejemplo, en las referencias 123 y 124.

L. Péptidos de muramilo

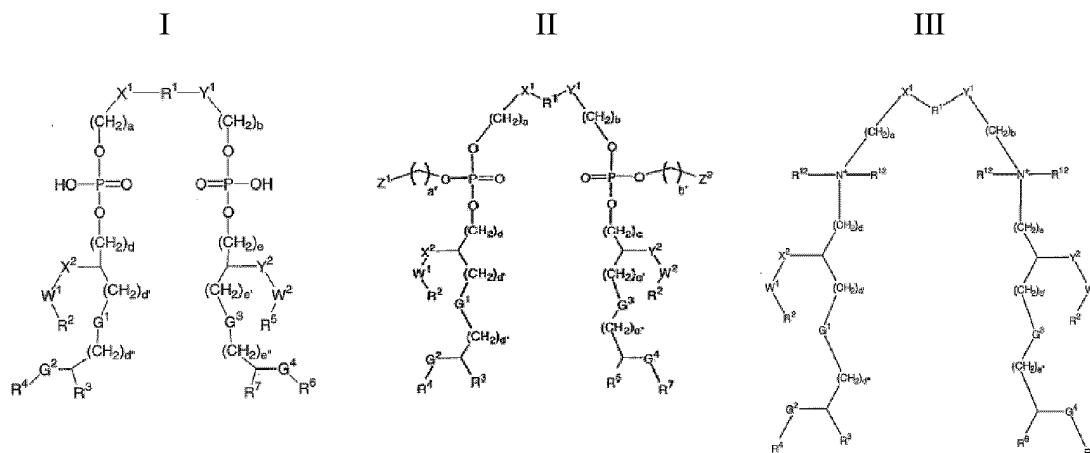
- 15 Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina MTP-PE).

M. Compuestos de imidazoquinolona

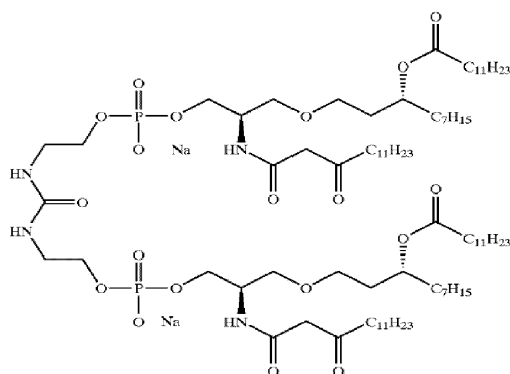
- 20 Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen Imiquimod ("R-837") [125, 126], Resiquimod ("R-848") [127], y sus análogos; y sus sales (por ejemplo, sales de clorhidrato). Los detalles adicionales sobre las imidazoquinolinas inmunoestimuladoras se pueden encontrar en las referencias 128 a 132.

N. Ureas sustituidas

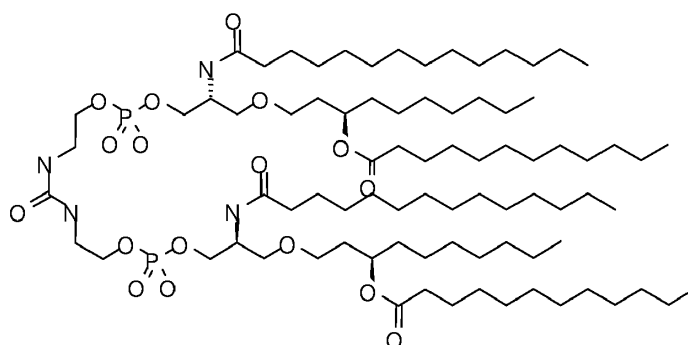
- 25 Las ureas sustituidas útiles como adyuvantes incluyen los compuestos de fórmula I, II o III, o sus sales:



- 30 como se define en la referencia 133, tal como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', 'ER 803022 o 'ER 804057' por ej.,:



ER804057

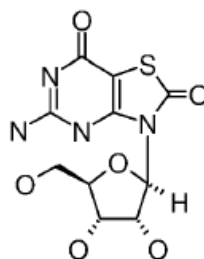


ER-803022:

O. Adyuvantes adicionales

5 Los adyuvantes adicionales que se pueden usar con la invención incluyen:

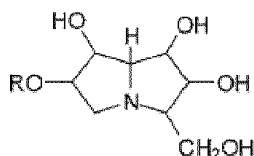
- Diguanilato cíclico ('c-di-GMP'), que se ha documentado como un adyuvante útil para las vacunas de *S. aureus* [134].
- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los desvelados en la referencia 135. Los procedimientos para formular, fabricar y seleccionar compuestos activos también se describen en la referencia 135. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares humanas de sangre periférica para la producción de citocinas, tales como TNF- α .
- Un compuesto de triptantrina, tal como los desvelados en la referencia 136. Los procedimientos para formular, fabricar y seleccionar compuestos activos también se describen en la referencia 136. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares humanas de sangre periférica para la producción de citocinas, tales como TNF- α .
- Un análogo de nucleósido, tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



20 y profármacos de los mismos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en las referencias 137 a 139, Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [140].

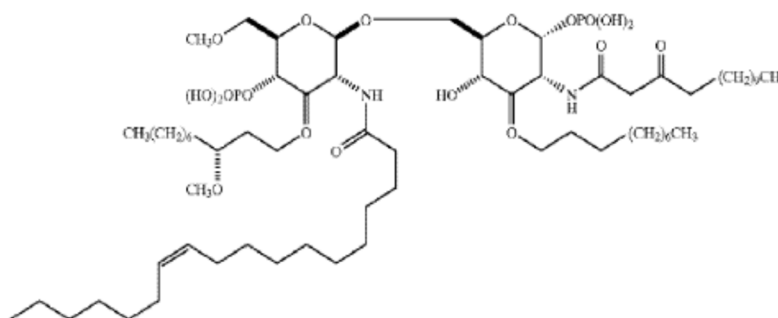
- Los compuestos desvelados en la referencia 141, incluyendo: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoleidona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobenzimidazol quinolinona (ABIQ) [142, 143], compuestos de hidraptalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de estero, compuestos de quinazolinona, compuestos de pirrol [144], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina, y compuestos de benzazol [145].

- Compuestos que contienen lípidos enlazados a una estructura principal acíclica que contiene fosfato, tales como el antagonista de TLR4 E5564 [146,147]:
- Un polímero de polioxidonio [148, 149] u otros derivados N-oxidados de polietileno-piperazina.
- Metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") [150].
- Un compuesto de polihidroxilado de pirrolizidina [151], tal como el que tiene la fórmula:



en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo lineales o ramificados, no sustituidos o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal o derivado aceptable para uso farmacéutico. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-di-*epi*-casuarina, *etc.*

- Un ligando de CDId, tal como una α -glucosilceramida [152-159] (por ejemplo, α -galactosilceramida), α -glucosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101,3"-O-sulfo-galactosilceramida, *etc.*
- Una gamma inulina [160] o derivado de la misma, tal como algammulina.



Combinaciones de adyuvantes

La invención también puede comprender combinaciones de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvantes se pueden usar en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [161]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) [162]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente, + un esteroide) [163]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [164]; (6) SAF, que contiene el 10 % de escualano, el 0,4 % de Tween 80TM, el 5 % de polímero de bloques de plurónico L121, y thr-MDP, bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado vorticialmente para generar una emulsión de partículas de tamaño más grande. (7) sistema adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualano al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y estructura de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxTM); y (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la referencia 48.

El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio es particularmente preferente, y los antígenos están generalmente adsorbidos a estas sales. El fosfato de calcio es otro adyuvante preferido. Otras combinaciones de adyuvantes preferidas incluyen combinaciones de adyuvantes de Th1 y Th2 tales como CpG y alumbre o resiquimod y alumbre. Se puede usar una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL.

Para mejorar la estabilidad térmica, una composición puede incluir un agente de protección de la temperatura. Este componente puede ser particularmente útil en composiciones con adyuvante (particularmente, aquellas que contienen un adyuvante mineral, tal como una sal de aluminio). Tal como se describe en la referencia 165, un agente protector

de temperatura líquido se puede añadir a una composición de vacuna acuosa para disminuir su punto de congelación, por ejemplo, para reducir el punto de congelación por debajo de 0 °C. Por lo tanto, la composición se puede almacenar por debajo de los 0 °C, pero por encima de su punto de congelación, para inhibir su degradación térmica. El agente protector de temperatura también permite la congelación de la composición mientras que protege los adyuvantes de sales minerales frente a la aglomeración o sedimentación tras la congelación y descongelación, y también puede proteger la composición a elevadas temperaturas, por ejemplo, por encima de 40 °C. Una vacuna acuosa de partida y el agente protector de temperatura líquido se pueden mezclar de manera que el agente protector de temperatura líquido forme del 1 al 80 % del volumen de la mezcla final. Los agentes protectores de temperatura adecuados deberían ser seguros para la administración humana, fácilmente miscibles/solubles en agua, y no deberían dañar otros componentes (por ejemplo, antígeno y adyuvante) en la composición. Los ejemplos incluyen glicerina, propilenglicol, y/o polietilenglicol (PEG). Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular promedio que varía desde 200 hasta 20.000 Da. En una realización preferida, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 300 Da ('PEG-300').

También se describe en la presente memoria una composición inmunogénica que comprende: (i) una o más VME de la invención y (ii) un agente protector de temperatura. Esta composición se puede formar mezclando (i) una composición acuosa que comprende una o más VME de la invención, con (ii) un agente protector de temperatura. La mezcla se puede almacenar por ejemplo, por debajo de los 0 °C, de 0-20 °C, de 20-35 °C, de 35-55 °C o más. Se puede almacenar en forma líquida o congelada. La mezcla se puede liofilizar. La composición se puede formar de manera alternativa mezclando (i) una composición seca que comprende una o más VME de la invención, con (ii) una composición líquida que comprende un agente protector de temperatura. Por lo tanto, el componente (ii) se puede usar para reconstituir el componente (i).

Las composiciones pueden generar tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta inmunitaria humoral. Esta respuesta inmunitaria inducirá preferentemente anticuerpos de larga duración (por ejemplo, neutralizantes) y una inmunidad mediada por células que puede responder rápidamente tras la exposición al patógeno (por ejemplo, a *Chlamydia*).

Se presume que dos tipos de linfocitos T, los CD4 y los CD8 son necesarios para iniciar y/o mejorar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Los linfocitos T CD8 pueden expresar un correceptor de CD8 y se denominan comúnmente linfocitos T citotóxicos (LTC). Los linfocitos T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con antígenos presentados en las moléculas de MHC de Clase I.

Los linfocitos T CD4 pueden expresar un correceptor de CD4, y se denominan comúnmente células T colaboradoras. Los linfocitos T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a las moléculas de MHC de clase II. Tras la interacción con una molécula de MHC de clase II, los linfocitos CD4 pueden secretar factores tales como citocinas. Estas citocinas secretadas pueden activar los linfocitos B, los linfocitos T citotóxicos, los macrófagos, y otras células que participan en una respuesta inmunitaria. Las células T colaboradoras o células CD4+ pueden dividirse a su vez en dos subconjuntos funcionalmente distintos: Fenotipo TH1 y fenotipo TH2 que difieren en su función citocínica y efectora.

Las células TH1 activadas mejoran la inmunidad celular (incluyendo un aumento en la producción de LTC específicos de antígeno) y por tanto son de valor particular en la respuesta a las infecciones intracelulares. Las células TH1 activadas pueden secretar una o más de IL-2, IFN- γ , y TNF- β . Una respuesta inmunitaria de TH1 puede dar como resultado reacciones inflamatorias locales mediante la activación de macrófagos, células NK (linfocitos citolíticos naturales) y linfocitos T CD8 citotóxicos (LTC). Una respuesta inmunitaria de TH1 también puede actuar para expandir la respuesta inmunitaria mediante la estimulación del crecimiento de linfocitos B y T con IL-12. Los linfocitos B estimulados por TH1 pueden secretar IgG2a.

Las células TH2 activadas mejoran la producción de anticuerpos y son, por tanto, de valor en la respuesta a infecciones extracelulares. Los linfocitos TH2 activados pueden secretar uno o más de IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10. Una respuesta inmune de TH2 puede dar como resultado la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria para una futura protección.

Una respuesta inmunitaria mejorada puede incluir una o más de una respuesta inmunitaria de TH1 y una respuesta inmunitaria de TH2.

Una respuesta inmunitaria de TH1 puede incluir uno o más de un aumento en LTC, un aumento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de TH1 (tal como IL-2, IFN- γ , y TNF- β), un aumento en los macrófagos activados, un aumento en la actividad de las NK, o un aumento en la producción de IgG2a. Preferentemente, Preferentemente, la respuesta inmunitaria de TH1 mejorada incluirá un aumento en la producción de IgG2a.

Una respuesta inmunitaria de TH1 se puede promover usando un adyuvante de TH1. Un adyuvante de TH1 generalmente promoverá niveles elevados de producción de IgG2a relacionados con la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes de TH1 adecuados para su uso en la invención pueden incluir por ejemplo formulaciones de saponina, virosomas y partículas de tipo virus, derivados no tóxicos de lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS),

oligonucleótidos inmunoestimuladores. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como los oligonucleótidos que contiene un motivo de CpG, son adyuvantes TH1 preferidos para su uso en la invención.

Una respuesta inmunitaria de TH2 puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de TH2 (tal como IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10), o un aumento en la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria. Preferentemente, la respuesta inmunitaria de TH2 mejorada incluirá un aumento en la producción de IgG1.

La respuesta inmunitaria de TH2 se puede promover usando un adyuvante de TH2. Un adyuvante de TH2 generalmente promoverá niveles elevados de producción de IgG1 relacionados con la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes de TH2 adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, emulsiones de aceite, y toxinas ADP-ribosilantes y derivados detoxificados de las mismas. Las composiciones que contienen minerales, tales como sales de aluminio son adyuvantes de TH2 preferidos para su uso en la invención.

También se describe en la presente memoria una composición que comprende una combinación de un adyuvante de TH1 y un adyuvante de TH2. Tal composición puede generar una respuesta mejorada de TH1 y TH2, es decir, un aumento en la producción tanto de IgG1 como de la producción de IgG2 en relación con la inmunización sin un adyuvante. La composición que comprende una combinación de un adyuvante de TH1 y TH2 puede generar una respuesta inmunitaria elevada de TH1 y TH2 en relación con un único adyuvante (es decir, en relación con la inmunización con un adyuvante solo de TH1 o la inmunización con un adyuvante solo de TH2).

La respuesta inmunitaria puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria de TH1 y una respuesta de TH2. La respuesta inmunitaria puede proporcionar una o ambas de una respuesta mejorada de TH1 y una respuesta mejorada de TH2.

La respuesta inmunitaria mejorada puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica o de la mucosa. La respuesta inmunitaria puede proporcionar uno o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica mejorada y una respuesta inmunitaria de la mucosa mejorada. La respuesta inmunitaria de la mucosa puede ser una respuesta inmunitaria de TH2. La respuesta inmunitaria de la mucosa incluye un aumento en la producción de IgA.

Procedimiento de tratamiento y administración de la vacuna

También se describe en la presente memoria un procedimiento para aumentar una respuesta inmunitaria en un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una OMV o de la composición inmunogénica de la invención. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. El procedimiento puede generar una respuesta de refuerzo.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para inmunizar un mamífero frente a una infección por *Chlamydia*, preferentemente frente a la infección por *C. trachomatis*, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una OMV o una composición inmunogénica de la invención.

También se describe en la presente memoria una OMV de la invención en combinación con un antígeno adicional para su uso combinado como un medicamento para la administración simultánea, separada o secuencial, por ejemplo, para su uso en el aumento de una respuesta inmunitaria en un mamífero.

La invención también proporciona una OMV o una composición inmunogénica para su uso en terapia.

También se describe en la presente memoria el uso de una OMV de la invención en la fabricación de un medicamento para el aumento de una respuesta inmunitaria en un mamífero. Al generar una respuesta inmunitaria en el mamífero mediante estos usos y procedimientos, el mamífero se puede proteger frente a la infección por el patógeno, por ejemplo, frente a la infección por *Chlamydia*. Más particularmente, el mamífero se puede proteger frente a la infección por *Chlamydia trachomatis*. La invención es eficaz frente a diversos serotipos diferentes de *Chlamydia*, pero puede ser particularmente útil en la protección frente a enfermedades que son resultado de la infección de *Chlamydia* de cepas del serotipo D.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la invención también proporciona una OMV, un anticuerpo o una composición inmunogénica para uso como un medicamento (por ejemplo, una vacuna). En una realización, la OMV, el anticuerpo o la composición inmunogénica se usan para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de la infección por *Chlamydia* (preferentemente *C. trachomatis*) en un mamífero. También se describe en la presente memoria un procedimiento para tratamiento, prevención o diagnóstico de infección por *Chlamydia* (preferentemente, infección por *C. trachomatis*) en un paciente (preferentemente un mamífero), que comprende la administración de una cantidad eficaz para uso terapéutico de una OMV o un anticuerpo de la invención.

La OMV o el anticuerpo descritos en la presente memoria puede ser para uso en el tratamiento o la prevención de infección por *Chlamydia* o una afección asociada (por ejemplo, tracoma, ceguera, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad, embarazo ectópico, dolor pélvico crónico, salpingitis, uretritis, epididimitis, neumonía infantil, carcinoma de células escamosas del cuello uterino, infección por VIH, etc.), preferentemente, infección por *C.*

trachomatis (tal como una afección ocular, una afección del tracto urogenital o un linfogranuloma venéreo invasivo que está causado por *C. trachomatis*). La composición inmunogénica puede ser eficaz de manera adicional o como alternativa frente a *C. pneumoniae*.

En algunas realizaciones, la OMV de la presente invención es para uso en el aumento de anticuerpos neutralizantes frente a la infección por un patógeno particular. El patógeno es preferentemente una bacteria o un virus. Los ejemplos de bacterias adecuadas son *Chlamydia*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *E. coli* y *Helicobacter*. Los ejemplos de virus adecuados son VIH, el virus de la gripe y el virus de Epstein Barr. Preferentemente, la OMV es para uso en el aumento de anticuerpos neutralizantes frente a *Chlamydia*, por ejemplo, frente a *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* o *C. muridarum*.

El mamífero es preferentemente un ser humano. Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar tanto a niños como a adultos. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño que está aprendiendo a andar o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a los niños también se puede administrar a los adultos, por ejemplo, para evaluar su seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc. Por lo tanto, un paciente humano puede ser de menos de 1 año de edad, de 1-5 años de edad, de 5-15 años de edad, de 15-55 años de edad, o al menos de 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son personas que están en la pubertad, adolescentes, personas sexualmente activas, en la vejez (por ejemplo, ≥50 años de edad, ≥60 años de edad, y preferentemente ≥65 años), en la infancia (por ejemplo, ≤5 años de edad), pacientes hospitalizados, personal sanitario, las fuerzas armadas y efectivos militares, mujeres embarazadas, los enfermos crónicos o pacientes inmunodeprimidos. Las vacunas no solo son adecuadas para estos grupos, sin embargo, y se pueden usar de manera más general en una población.

Las vacunas producidas por la invención se pueden administrar a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la consulta médica o la visita a un profesional de la salud o a un centro de vacunación) otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna de papilomavirus tal como Cervarix® o Gardasil®; una vacuna del tétanos, de difteria y de pertussis acelular tal como Tdap, DTaP o Boostrix®; una vacuna de la rubeola tal como MMR; o una vacuna de la tuberculosis tal como la BCG. Los ejemplos de otras vacunas producidas por la invención que se pueden administrar sustancialmente al mismo tiempo que la vacuna producida por la invención son una vacuna del sarampión, una vacuna de paperas, una vacuna de varicela, una vacuna de MMRV, una vacuna de difteria, una vacuna de tétanos, una vacuna de pertussis, una vacuna DPT, una vacuna de *H. influenzae* de tipo b conjugada, una vacuna de poliovirus inactivo, una vacuna del virus de la hepatitis B, una vacuna de conjugado meningocócico (tal como la vacuna tetravalente A-C-W135-Y), una vacuna del virus respiratorio sincitial, etc.

En una realización preferente, la OMV de la invención se usa para generar anticuerpos que son capaces de neutralizar la infectividad o la virulencia de *Chlamydia*, por ejemplo, de *Chlamydia trachomatis*. Los anticuerpos neutralizantes se pueden usar como una vacuna capaz de neutralizar CE infecciosos neutralizantes. En una realización, la VME de la invención se usa para generar anticuerpos que son capaces de neutralizar la infectividad y/o la virulencia de *Chlamydia*. Por lo tanto, también se describen en la presente memoria anticuerpos para neutralizar la infectividad y/o la virulencia de *Chlamydia*.

También se describe en la presente memoria el uso de una OMV o un anticuerpo de la presente memoria en la fabricación de: (i) un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana; (ii) un reactivo de diagnóstico para la detección de la presencia de bacterias o de anticuerpos generados frente a las bacterias; y/o (iii) un reactivo que puede generar anticuerpos contra las bacterias. Dichas bacterias son preferentemente de *Chlamydia*, por ejemplo, *Chlamydia trachomatis* o *Chlamydia pneumoniae*, pero son preferentemente de *Chlamydia trachomatis*.

Procedimientos de detección y de diagnóstico

También se describe en la presente memoria un procedimiento para detectar un patógeno, tal como una bacteria de *Chlamydia* (por ejemplo, *C. trachomatis*) en una muestra. El procedimiento puede implicar la detección de la presencia o ausencia de un antígeno del patógeno o de ácido nucleico que codifica un antígeno del patógeno. El procedimiento se puede usar para la prueba microbiológica, para el diagnóstico clínico o no clínico, etc. La detección del antígeno puede implicar, por ejemplo, poner en contacto la muestra con un anticuerpo descrito en la presente memoria, tal como un anticuerpo marcado. La detección del antígeno de ácido nucleico puede implicar cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, con base en la hibridación de ácido nucleico, tal como mediante el uso de northern o southern blots, micromatrices de ácido nucleico o 'chips de genes', reacciones de amplificación (por ejemplo, PCR, SDA, SSSR, LCR, TMA, NASBA, etc.).

También se describe en la presente memoria un procedimiento para detectar si un paciente se ha infectado con un patógeno (por ejemplo, una bacteria de *Chlamydia* tal como *C. trachomatis*), que comprende una etapa de detectar en una muestra tomada del paciente, la presencia o ausencia de un anticuerpo descrito en la presente memoria. La detección del antígeno puede implicar, por ejemplo, poner en contacto la muestra con un anticuerpo descrito en la presente memoria.

La presencia del antígeno (por ejemplo, el CT823), o de ácido nucleico que codifica el antígeno (por ejemplo, el antígeno CT823) o de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-CT823), indica la presencia del patógeno (por

ejemplo, *C. trachomatis*) en la muestra. En un entorno de diagnóstico clínico, por lo tanto, los resultados del procedimiento se pueden usar para educar o dictar una estrategia terapéutica para un paciente, por ejemplo, una elección de antibióticos, etc.

- 5 También se describe en la presente memoria un procedimiento para detectar un antígeno (por ejemplo, CT823), que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-CT823) con una muestra biológica en condiciones adecuadas para la formación de un complejo anticuerpo-antígeno; y (b) detectar el complejo.

- 10 También se describe en la presente memoria un procedimiento para detectar anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-CT823), que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un antígeno con una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre o de suero) en condiciones adecuadas para la formación de complejos anticuerpo-antígeno; y (b) detectar los complejos.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para diagnosticar una infección por un patógeno (por ejemplo, infección por *Chlamydia*), que comprende:

- 15 (a) generar un anticuerpo frente a un antígeno heterólogo presentado en el ámbito de una VME de acuerdo con la invención;
- (b) poner en contacto el anticuerpo de la etapa (a) con una muestra biológica de la que se sospecha que está infectada por el patógeno (por ejemplo, *Chlamydia*) en condiciones adecuadas para la formación de complejos anticuerpo-antígeno; y
- 20 (c) detectar dichos complejos, en el que la detección de dicho complejo es indicativo de la infección por el patógeno (por ejemplo, infección por *Chlamydia*).

- 25 También se describe en la presente memoria el uso de OMV de la invención en inmunoensayos para detectar los niveles de anticuerpos (o, por el contrario, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden usar para detectar los niveles de proteína). Se pueden desarrollar inmunoensayos basados en antígenos recombinantes bien definidos para sustituir los procedimientos de diagnóstico invasivos. Los anticuerpos para las proteínas de las muestras biológicas, incluyendo, por ejemplo, muestras de sangre o de suero, se pueden detectar. El diseño de los inmunoensayos está sujeto a una gran variación, y se conocen en la técnica una variedad de estos. Los protocolos para el inmunoensayo se pueden basar, por ejemplo, en los ensayos competitivos o de reacción directa o de tipo sándwich. Los protocolos también pueden, por ejemplo, usar soportes sólidos, o pueden ser mediante
- 30 inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de anticuerpos o polipéptidos marcados; los marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o de tinción. Los ensayos que amplifican las señales de la sonda también son conocidos; cuyos ejemplos son los ensayos que utilizan biotina y avidina, y los inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tal como los ensayos ELISA.

- 35 También se describen en la presente memoria kits adecuados para el inmunodiagnóstico y que contienen los reactivos marcadores apropiados, que se construyen empacando los materiales apropiados, incluyendo las composiciones de la invención, en recipientes adecuados, junto con los reactivos y materiales restantes (por ejemplo, tampones adecuados, soluciones salinas, etc) requeridos para llevar a cabo el ensayo, así como un conjunto adecuado de instrucciones del ensayo.

Pruebas de la eficacia de las composiciones

- 40 La eficacia de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se puede evaluar *in vitro* e *in vivo* en modelos animales antes de la administración al huésped, por ejemplo, ser humano. Por ejemplo, la neutralización *in vitro* por Peterson y col. (1988) es adecuada para evaluar las composiciones de vacuna dirigidas a *Chlamydia trachomatis*.

- 45 Una forma de verificar la eficacia del tratamiento terapéutico implica supervisar la infección (por ejemplo, la infección por *C. trachomatis*) tras la administración de las composiciones de la invención. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica el control de respuestas inmunitarias tanto de manera sistémica (tales como el control del nivel de producción de IgG1 e IgG2) y mucosal (tal como el control del nivel de producción de IgA) frente a los antígenos (por ejemplo frente a antígenos de *Chlamydia trachomatis*) en las composiciones de la invención tras la administración de la composición. Normalmente, las respuestas de anticuerpos específicos del patógeno (por ejemplo,
- 50 *Chlamydia*) en el suero se determinan tras la inmunización pero antes de la exposición mientras que se determinan respuestas de anticuerpos específicos del patógeno de la mucosa (por ejemplo, *Chlamydia*) tras la inmunización y antes de la exposición.

- Un ejemplo de tal prueba *in vitro* se describe a continuación. El antisuero hiperinmunológico se diluye en PBS que contiene el 5 % de suero de cobaya, como una fuente complementaria. *Chlamydia trachomatis* (10⁴ IFU; unidades formadoras de inclusión) se añade a las diluciones de antisueros. Las mezclas de antígeno-anticuerpo se incuban a
- 55 37 °C durante 45 minutos y se inoculan en monocapas duplicadas de células Hep-2 o HeLa confluentes contenidas

en frascos de cristal (por ejemplo, 15 por 45 mm) que se han lavado dos veces con PBS antes de la inoculación. Las células de la monocapa se infectan mediante centrifugación a 1000X g durante 1 hora seguido por la incubación estacionaria a 37 °C durante 1 hora. Las monocapas infectadas se incuban durante 48 o 72 horas, se fijan y se tiñen con anticuerpos específicos de *Chlamydia*, tales como anti-PPME. Las células que llevan la inclusión se recuentan en diez campos a un aumento de 200X. El título de neutralización se asigna sobre la dilución que da el 50 % de inhibición en comparación con las monocapas de control/IFU.

Otro modo de evaluar la inmunogenicidad de las composiciones de la presente invención es expresar las proteínas de manera recombinante para seleccionar sueros o secreciones de las mucosas de pacientes mediante inmunotransferencia y/o micromatrices. Una reacción positiva entre la proteína y la muestra del paciente indica que el paciente ha desarrollado una respuesta inmunitaria para el antígeno heterólogo en cuestión. Este procedimiento también se puede usar para identificar antígenos inmunodominantes y/o epítomos en antígenos.

La eficacia de las composiciones de vacuna también se puede determinar *in vivo* exponiendo modelos animales de infección (por ejemplo, infección por *Chlamydia trachomatis*), por ejemplo, cobayos o ratones, con las composiciones de vacuna. Por ejemplo, se pueden realizar estudios *in vivo* de exposición a la composición de la vacuna en el modelo de cobaya de infección por *Chlamydia trachomatis*. A continuación se da un ejemplo de este tipo de estrategia. Las cobayas hembra que pesan 450 - 500 g se instalan en una jaula en una sala ambientalmente controlada con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y se inmunizan con composiciones de vacuna a través de una variedad de rutas de inmunización. Tras la vacunación, los cobayos se infectan en el tracto genital con el agente de conjuntivitis de inclusión en cobayos (GPIC), que se ha cultivado en células HeLa o McCoy (Rank et al. (1988)). Cada animal recibe aproximadamente $1,4 \times 10^7$ unidades formadoras de inclusión (IFU) contenidas en 0,05 ml de tampón sacarosa-fosfato-glutamato, a pH 7,4 (Schacter, 1980). El trascurso de la infección se controla mediante la determinación del porcentaje de células que llevan la inclusión por inmunofluorescencia con antisuero específico de GPIC, o por frotis teñido con Giemsa de un raspado del tracto genital (Rank y col., 1988). Los títulos de anticuerpo en el suero se determinan mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

Como alternativa, se pueden realizar estudios *in vivo* de exposición a composiciones de vacuna en el modelo murino de *Chlamydia trachomatis* (Morrison et al., 1995). A continuación se da una descripción de un ejemplo de este tipo de estrategia. Los ratones hembra de 7 a 12 semanas de vida recibieron 2,5 mg de depo-provera por vía subcutánea en los días 10 t 3 antes de la infección vaginal. Tras la vacunación, los ratones se infectan en el tracto genital con 1.500 unidades formadoras de inclusión de *Chlamydia trachomatis* contenidas en 5 ml de tampón sacarosa-fosfato-glutamato, a pH 7,4. El trascurso de la infección se controla mediante la determinación del porcentaje de células que llevan la inclusión por inmunofluorescencia con antisuero específico de *Chlamydia trachomatis*, o por frotis teñido con Giemsa de un raspado del tracto genital de un ratón infectado. La presencia de los títulos de anticuerpo en el suero de un ratón se determinan mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

General

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se ilustran por completo en las referencias. Véanse, por ejemplo, las referencias 166-173, etc.

Cuando la descripción se refiere a un "epitopo", este epitopo puede ser un epitopo de células B y/o un epitopo de células T. Tales epitopos se pueden identificar empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [174,175] o procedimientos similares), o se pueden predecir (por ejemplo, usando el índice antigénico de Jameson-Wolf [176], estrategias basadas en matrices [177], MAPITOPE [178], TEPITOPE [179,180], redes naturales [181], OptiMer & EpiMer [182, 183], ADEPT [184], Tsites [185], hidrofiliidad [186], índice antigénico [187] o los procedimientos desvelados en las referencias 188-192, etc.). Los epítomos son las partes de un antígeno que se reconocen mediante y se unen a los sitios de unión a antígeno de los anticuerpos o los receptores de linfocitos T, y también pueden denominarse "determinantes antigénicos".

Cuando se omite un "dominio" del antígeno, esto puede implicar la omisión de un péptido señal, de un dominio citoplásmico, de un dominio transmembrana, de un dominio extracelular, etc.

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como también "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando están alineadas, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar las dos secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o la identidad de secuencia se pueden determinar usando programas informáticos conocidos en la materia, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la ref. 193. Una alineación preferida se determina mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman que usa una búsqueda de hueco afín con una penalización de hueco abierto de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se desvela en la ref. 194.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra los componentes del complejo Tol-Pal;

La Figura 1B es una representación esquemática de la inactivación del gen *tolR* en el ADN cromosómico de *E. coli* IHE 3034 usando la recombinación homóloga y sustituyéndolo con el casete de resistencia a la kanamicina;

La Figura 2 muestra el contenido proteico liberado en el sobrenadante del cultivo de *E. coli* de tipo silvestre (carril a mano izquierda) y de la cepa Δ TolR de *E. coli* (carril a mano derecha);

La Figura 3 es un gel SD-PAGE que muestra las proteínas totales de *E. coli* Δ TolR que expresa TC0106 (carril 1), TC0052 (carril 2), TC0727 (carril 3) y TC0210 (carril 4). Los marcadores de bajo peso molecular se proporcionan en el lado izquierdo del gel. Los círculos en los carriles 1, 2 y 4 indican la expresión de las proteínas TC0106, TC0052 y TC0210, respectivamente;

La Figura 4 es una representación esquemática de un protocolo de preparación de VME;

La Figura 5A muestra los resultados de análisis por transferencia de Western para (i) TC0052 (41 kDa), (ii) TC0106 (47 kDa), (iii) TC0210 (53 kDa) y (iv) TC0727 (58 kDa). Para el análisis por transferencia de Western (i), se analizaron las siguientes muestras de proteína: *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que expresa el antígeno heterólogo (carril 1); las proteínas totales contenidas en la OMV que expresa el antígeno heterólogo (carril 2); y las proteínas contenidas en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que no expresa el antígeno de Chlamydia (carril 3). Para cada uno de los Western blots (ii), (iii) y (iv), se analizaron las siguientes muestras de proteína: la proteína recombinante purificada de los clones de expresión de *E. coli* (carril 1); *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que expresa el antígeno heterólogo (carril 2); las proteínas totales contenidas en la OMV que expresa el antígeno heterólogo (carril 3); y las proteínas contenidas en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que no expresa el antígeno de Chlamydia (carril 4). Cada Western blot se incubó con suero obtenido mediante inmunización de ratones con el respectivo antígeno recombinante de Chlamydia purificado. Las flechas indican las bandas que se corresponden con los respectivos antígenos heterólogos.

La Figura 5B muestra los resultados de análisis por transferencia de Western para TC0313 y TC0890. Las muestras que se analizaron son las siguientes: marcadores de peso molecular estándar (carril de la izquierda); TC0313His (23 kDa) recombinante purificada de los clones de expresión de *E. coli* (carril 1); proteína TC0313 total contenida en la OMV que expresa el antígeno heterólogo (carril 2); proteínas contenidas en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que no expresa el antígeno de Chlamydia (carril 3); TC0890His (19 kDa) recombinante purificada de los clones de expresión de *E. coli* (carril 4); proteína TC0890 total contenida en la OMV que expresa el antígeno heterólogo (carril 5); proteínas contenidas en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que no expresa el antígeno de Chlamydia (carril 6). Los carriles 1, 2 y 3 se incubaron con sueros obtenidos mediante inmunización de ratones con antígeno recombinante TC0313 purificado (23 kDa), mientras que los carriles 4, 5 y 6 se incubaron con sueros obtenidos mediante la inmunización de ratones con antígeno recombinante TC0890 purificado (19 kDa). Los carriles se enumeran de izquierda a derecha. Las flechas indican las bandas correspondientes con los antígenos heterólogos de 23 kDa y de 19 kDa, respectivamente;

La Figura 5C muestra los resultados de los análisis por transferencia de Western de izquierda a derecha para (i) TC0651 (53 kDa), (ii) TC0551 (32 kDa) y (iii) TC0431 (90 kDa), respectivamente. Para TC0651, el carril 1 muestra las proteínas contenidas en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que no expresa antígeno de Chlamydia, mientras que el carril 2 muestra la proteína TC0651 total contenida en OMV que expresa el antígeno heterólogo. Para TC0551, el carril 1 muestra TC0551His (32 kDa) recombinante purificada de los clones de expresión de *E. coli*, el carril 2 muestra TC0551 contenida en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que expresa TC0551 y el carril 3 muestra proteínas contenidas en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que no expresa el antígeno de Chlamydia. Para TC0431, el carril 1 muestra TC0431His (90 kDa) recombinante purificada de los clones de expresión de *E. coli*, el carril 2 muestra proteínas contenidas en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que no expresa el antígeno de Chlamydia y el carril 3 muestra TC0431 contenida en la OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que expresa TC0431;

La Figura 5D muestra los resultados de los análisis por transferencia de Western de izquierda a derecha para (i) TC0431 (90 kDa), y (ii) TC0052 (41 kDa). Para cada uno de los Western blot, el carril 1 se cargó con una preparación de OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que expresa el antígeno de Chlamydia, mientras que el carril 2 se cargó con una preparación de OMV preparada a partir de *E. coli* BL21(DE3) Δ TolR que no expresa antígenos de Chlamydia (usados como un control negativo). La Figura 5D (i) muestra la proteína TC0431 total contenida en una OMV que expresa el antígeno heterólogo (véase el carril 1).

La Figura 6 muestra la curva de crecimiento de *E. coli* para diversos mutantes *E. coli* Δ TolR preparados en el Ejemplo 3. El tiempo en horas se indica a lo largo del eje X; la DO600 se indica a lo largo del eje Y. La curva de crecimiento de *E. coli* que expresa TC0210 se indica con una flecha. ($\blacklozenge$) es TC0210pET

BL21(DE3) Δ ToIR; (—■—) es TC0052pET BL21(DE3) Δ ToIR; (—△—) es TC0106pET BL21(DE3) Δ ToIR; (—✱—) es TC0313pET BL21(DE3) Δ ToIR; (—✱—) es TC0431pET BL21(DE3) Δ ToIR; (—●—) es TC0551pET BL21(DE3) Δ ToIR; (—+—) es TC0651pET BL21(DE3) Δ ToIR; (—■—) es TC0727pET BL21(DE3) Δ ToIR y (—■—) es TC0890pET BL21(DE3) Δ ToIR.

La Figura 7 es un diagrama esquemático de experimentos de rasurado y de espectrometría de masas llevados a cabo para confirmar la presencia del antígeno heterólogo en la preparación de VME. El diagrama muestra (partiendo de la parte superior izquierda y progresando en dirección de las agujas del reloj): i) rasurar la VME, ii) recuperar los sobrenadantes, iii) DTT + detergente a 100 °C durante 10 minutos, iv) recuperación de péptidos; v) separación de los péptidos mediante cromatografía de RP fragmentación de péptidos mediante MS/MS ESI-Q-TOF y vi) identificación de la proteína;

La Figura 8 muestra la secuencia del antígeno TC0210 de *C. muridarum*. El péptido reconocido en el rasurado y en el análisis de espectrometría de masas se resalta en negrita y subrayado;

La Figura 9 es una alineación de secuencia de TC0210 de *C. muridarum* (secuencia de búsqueda) y CT823 de *C. trachomatis* (secuencia objeto);

La Figura 10A muestra un análisis de FACS de anticuerpo que se une a la superficie de células completas de Chlamydia;

La Figura 10B muestra los resultados de un experimento de micromatriz de proteína en el que los antígenos de *Chlamydia* se expresan en *E. coli*, se purifican por afinidad y se detectan sobre portaobjetos de cristal en un formato de micromatriz. Se usaron dos grupos de sueros humanos para cada antígeno: Sueros MIF positivos (barra de la izquierda) y sueros MIF negativos (barra de la derecha). Los antígenos aparecen en el eje X. LDe izquierda a derecha, los antígenos enumerados sobre el eje X son CT681His, CT823His, CT443His, CT456GST, CT110GST, CT622His, CT089His, CT415GST, CT119GST, CT049GST, CT589GST, CT372GST, CT077His, CT559His, CT322His, CT316His, CT350GST, CT381His, CT355GST, CT389GST, CT127GST, CT157GST, CT567His, CT266His, CT470His, CT398His y CT114His. El % de suero está sobre el eje Y. Cada barra vertical representa la intensidad media obtenida con los sueros (suero positivo en MIF frente a negativo en MIF) sobre antígenos únicos. El segundo dato de la izquierda se refiere a CT823.

La Figura 10C muestra los antígenos que dan una alta señal en un ensayo sign-bkg. Los antígenos se enumeran sobre el eje X y la señal se da sobre el eje Y. Las microplacas de proteína de Chlamydia se analizaron mediante inmunotinción con suero de ratones que estaban (de izquierda a derecha) i) no inmunizados (suero preinmunológico), ii) inmunizados con CE inactivados térmicamente (anti-CE inactivados térmicamente antes de la exposición), iii) inmunizados con CE inactivados térmicamente y después expuestos con CE vivos (anti-CE inactivados térmicamente tras la exposición), iv) inmunizados con CE vivos (anti-CE vivos antes de la exposición); y v) inmunizados con CE vivos y después expuestos nuevamente con CE vivos (anti-CE vivos tras la exposición). Los anticuerpos están a una dilución de 1:100. Los antígenos que dan una baja señal de menos de 800 no se muestran. De izquierda a derecha, los antígenos son: CT016His, CT045His, CT077His, CT242His, CT266His, CT396His, CT443His, CT444His, CT480His, CT547His, CT587His, CT600His, CT823His, CT859His, ctEBpel, ctEBsup, ctGst381, ctGst398, ctGst480, GstNN y NNhis;

La Figura 10D muestra los resultados de Western blot con suero obtenido a partir de ratones inmunizados con, de izquierda a derecha (i), TC0210His (ii) preparación de OMV de BL21(DE3) Δ ToIR TC0210 y (iii) preparación de OMV de BL21(DE3) Δ ToIR, respectivamente. 200 ng de HtrA recombinante (carril 1) y CE de *C. muridarum* (aproximadamente 10 CE) (carril 2) se disolvieron en tampón de carga y se separaron por tamaño mediante SDS-PAGE (gel 4-12 %) en condiciones reductoras y se sometieron a electrotransferencia en membranas de nitrocelulosa. Las membranas se saturaron hasta el día siguiente con leche Marwell al 10% en PBS (tampón de fosfato), Triton al 0,1 % y después se incubaron con suero obtenido de ratones inmunizados con, de izquierda a derecha, (i) TC0210His, (ii) preparación de OMV de BL21(DE3) Δ ToIR TC0210 y (iii) preparación de OMV de BL21(DE3) Δ ToIR, respectivamente. Una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amersham Bioscience TM) se usó como el anticuerpo secundario.

La Figura 10E muestra un análisis de FACS de anticuerpo que se une a la superficie de células completas de Chlamydia. Los picos, de izquierda a derecha, se corresponden con CE purificados de *C. muridarum* incubados con (i) suero anti-His (pico llenado, ubicado más a la izquierda), (ii) suero obtenido de ratones inmunizados con la preparación de OMV de BL21(DE3) Δ ToIR (segundo pico de la izquierda), (iii) suero obtenido de ratones inmunizados con TC210 (segundo pico de la derecha) o (iv) BL21(DE3) Δ ToIR TC0210 (pico ubicado más a la derecha).

La Figura 11 es un diagrama esquemático de un protocolo de inmunización para ratones BALB/c;

La Figura 12 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de neutralización de *C. muridarum* que usa suero de ratones BALB/c que se han inmunizado con OMV de *E. coli* BL21(DE3) Δ ToIR que presenta OMV (5 μ g) (—□—), OMV-TC0210 (5 μ g) (—●—), OMV (50 μ g) (—◇—), OMV-TC0210 (50 μ g) (—■—), y MOMP

(—○—). La dilución del suero se presenta a lo largo del eje X y el % de neutralización se presenta sobre el eje Y.

La Figura 13 son los resultados de dos análisis por transferencia de Western. Las membranas se incubaron con suero obtenido mediante la inmunización de ratones con PBS + alumbre + 50 µg de preparación de OMV de *E. coli* BL21(DE3)Δ*TolR* (Western blot a la izquierda) o PBS + alumbre + 50 µg de preparación de OMV de *E. coli* BL21(DE3)Δ*TolR*-TC0210. En cada análisis por transferencia de Western, los marcadores de peso molecular se presentan sobre el lado izquierdo y el carril 1 se carga con 200 ng de proteína purificada TC0210His (53 kDa). La flecha muestra la banda que se corresponde con la proteína TC0210His de 53 kDa;

La Figura 14 es un diagrama de barras que muestra los resultados de un ensayo ELISA. Las cuatro muestras de suero que se usaron son de ratones inmunizados con (de izquierda a derecha) 5 µg de VME + alumbre; 50 µg de VME + alumbre; 5 µg de VME-TC0210 + alumbre; 50 µg de VME-TC0210 + alumbre. Se proporcionan tres resultados para cada una de las muestras de suero tal como sigue (de izquierda a derecha): IgG2a, IgG1 e IgGtot. El título de ELISA se muestra sobre el eje Y;

La Figura 15 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de neutralización de *C. muridarum* que usa suero de ratones BALB/c que se han inmunizado con OMV de *E. coli* BL21(DE3)Δ*TolR* que presenta TC0210 (50 µg) (—■—); con TC0210His recombinante purificado (20 µg) (—▲—); con MOMP (20 µg) (—◆—) y solo con las OMV (50 µg) (—▲—). Los resultados son la media de 6 experimentos independientes. La dilución del suero se presenta a lo largo del eje X y el % de neutralización se presenta sobre el eje Y.

La Figura 16 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de neutralización de *C. trachomatis* que usa suero de ratones BALB/c que se han inmunizado con: MOMP de *C. trachomatis* (20 µg) (—◆—); OMV-TC0210 (50 µg) (—■—); MOMP *C. muridarum* (20 µg) (—◆—); CT823-His (20 µg) (—◆—); TC0210-His (20 µg) (—▲—) y OMV (50 µg) (—▲—). La dilución del suero se presenta sobre el eje X y el % de neutralización se presenta sobre el eje Y. Los resultados son la media de dos experimentos;

La Figura 17a es un diagrama esquemático de un protocolo de inmunización de ratones CD1;

La Figura 17b son los resultados de 6 análisis por transferencia de Western en los que se carga en cada uno 200 ng de proteína recombinante TC0210His purificada. De izquierda a derecha, las membranas se incubaron, respectivamente, con suero obtenido de ratones inmunizados con: Grupo 1 (50 µg de VME + alumbre); Grupo 2 (50 µg de VME-TC0210 + alumbre); Grupo 3 (20 µg TC0210His+50 µg de VME + alumbre); Grupo 4 (1 µg TC0210His + 50 µg de VME + alumbre); Grupo 5 (1 µg de TC0210 + alumbre) y Grupo 6 (20 µg de TC0210His + alumbre);

La Figura 17c muestra los análisis por transferencia de Western para (i) el grupo 2 y (ii) el grupo 4 en más detalle. La flecha indica la proteína TC0210 de 53 kDa. Se usó una dilución de suero de 1:200;

La Figura 18 es un diagrama de barras que muestra los resultados de un ensayo ELISA. El título de ELISA se muestra junto con el eje Y. Los grupos de inmunización se presentan a lo largo del eje X. De izquierda a derecha, las barras representan sueros de ratones inmunizados con: i) 50 µg OMV-TC0210 + alumbre; ii) 20 µg TC0210His + 50 µg OMV + alumbre; iii) 20 µg TC0210His + alumbre; 1 µg TC0210His + alumbre; 1 µg TC0210His + 50 µg OMV + alumbre, vi) 50 µg OMV;

La Figura 19 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de neutralización de *C. muridarum* que usa suero de ratones CD1 que se han inmunizado con a) MOMP (20 µg); b) OMV de *E. coli* BL21(DE3)Δ*TolR* que presenta TC0210 (50 µg); c) OMV de *E. coli* BL21(DE3)Δ*TolR* que no expresa ningún antígeno heterólogo (50 µg); d) TC0210-His (20 µg) recombinante purificado; e) 50 µg de OMV más TC0210His (1 µg). La dilución del suero se presenta a lo largo del eje X y el % de neutralización se presenta a lo largo del eje Y. Los resultados son la media de 6 experimentos independientes;

La Figura 20 muestra los resultados del experimento de mapeo del epítipo y muestra los diferentes epítipos del antígeno TC0210 que se reconocieron mediante el suero de ratones inmunizados con VME-TC0210 (parte superior), TC0210His (parte media) o VME (parte inferior);

La Figura 21 muestra dos geles de SDS PAGE en los que se cargaron: (i) 20 µg de una preparación de VME de *E. coli* BL21(DE3)Δ*TolR* (a mano izquierda); y (ii) 20 µg de una preparación de VME de *E. coli* BL21(DE3)Δ*ompA* (a mano derecha);

La Figura 22 es un gel de SDS PAGE que muestra el contenido proteico de *E. coli* BL21(DE3)Δ*ompA* y el contenido proteico de *E. coli* BL21(DE3)Δ*ompA* que expresa TC0210. Los carriles se cargaron con 5 µg, 10 µg y 20 µg, respectivamente. La banda de TC0210 se marca mediante la flecha;

La Figura 23 son los resultados de un experimento de espectrometría de masas llevado a cabo para confirmar la presencia del antígeno TC0210 en la preparación de VME.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA DESCRIPCIÓN

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos

Los siguientes materiales y procedimientos se usan en los ejemplos salvo indicación en contrario:

5 1) Cepas bacterianas, cultivos y reactivos:

La cepa Nigg de *Chlamydia muridarum* y cepa D/UW-3/CX de *C. trachomatis* serotipo D se cultivaron sobre monocapas confluentes de LLC-MK2 (ATCC CCL7) en medio esencial mínimo de Earle (EMEM) tal como se describe previamente [195]; [196]. La purificación de CE de *C. trachomatis* y *C. muridarum* se llevó a cabo mediante centrifugación de gradiente de densidad de renografin tal como se describe anteriormente [195]. Se cultivó aeróbicamente *Escherichia coli* BL21 (DE3) en medio de caldo Luria (LB) (Difco) a 37 °C. Cuando fue apropiado, se añadieron al medio ampicilina (100 µg/ml) e isopropil-β-D-galactopiranosido (IPTG; 1 mM). A menos que se especifique, todos los compuestos químicos en el presente estudio se encargaron a Sigma. Las enzimas de restricción y las enzimas de modificación fueron de New England Biolabs.

2) Clonación de genes y purificación de proteínas:

15 Para producir proteínas recombinantes tal como CT823, TC0210, TC0727, TC0651, TC0313, TC0106, TC0551, TC0431, TC0890, CT681 (MOMP de *C. trachomatis* [MOMP_{Ct}]) y TC0052 (MOMP de *C. muridarum* [MOMP_{cm}]), los genes se amplificaron por PCR a partir de ADN cromosómico de *C. trachomatis* y *C. muridarum* usando cebadores específicos que hibridan en los extremos 5' y 3' de cualquier gen y se clonaron en el plásmido pET21b+ (Invitrogen) para fusionar una secuencia de seis marcadores de histidina en el extremo 3'. La clonación y la purificación de las fusiones de His se realizaron como ya se ha descrito [196]. TC0727, TC0651, TC0106, TC0551, TC0431, TC0890, MOMP_{Ct} y MOMP_{cm} expresados como proteínas de fusión de His se purificaron a partir de la fracción de proteína insoluble, mientras que TC0313, CT823 y TC0210 expresados como proteínas de fusión de His se purificaron a partir de la fracción de proteína soluble de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

3) Construcción del mutante de delección BL21(DE3) ΔtolR:

25 El mutante ΔtolR se produjo sustituyendo la secuencia de codificación de tolR con un casete de resistencia a la kanamicina ("kmr"). Con este fin, se usó un protocolo de PCR de tres etapas para fusionar las regiones de aguas arriba y aguas abajo de *tolR* con el gen *kmr*. En resumen, las regiones de 528 pb aguas arriba y de 466 pb aguas abajo del gen *tolR* se amplificaron a partir de ADN genómico de *E. coli* BL21 (DE3) con el par de cebadores específico UpF (TCTGGAATCGAACTCTCTCG) (SEQ ID NO: 68)/UpR-kan (ATTTTGAAGACACAACGTGGCTTTTCATGGCTTACCCCTTGTTG) (SEQ ID NO: 69); DownF-kan (TTCACGAGGCAGACCTCATAAACATCTGCGTTTCCTTG) (SEQ ID NO: 70)/DownR (TTGCTTCTGCTTTAACTCGG) (SEQ ID NÚM.: 71), respectivamente. En paralelo, el casete de *kmr* se amplificó a partir del plásmido pUC4K usando los cebadores kan-F (ATGAGCCATATTCAACGGGAAAC) (SEQ ID NO: 72) y kan-R (TTAGAAAACTCATCGAGCATCAAA) (SEQ ID NO: 73). Finalmente, los tres fragmentos amplificados se fusionaron entre sí mezclando 100 ng de cada uno en una PCR que contiene los cebadores UpF/DownR. El fragmento lineal obtenido, en el que el gen *kmr* estuvo flanqueado por las regiones de aguas arriba y aguas abajo de *tolR*, se usó para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (hecha electrocompetente mediante tres etapas de lavado en agua fría) y los mutantes de *tolR* se seleccionaron cultivando en placa bacterias transformadas sobre placas de Luria-Bertani (LB) que contienen 30 µg/ml de kanamicina.

40 Las células de recombinación BL21 (DE3) se produjeron usando el sistema de recombinación homóloga altamente competente (operón *red*) [197]. En resumen, las células bacterianas electrocompetentes se transformaron con 5 µg de plásmido pAJD434 mediante electroporación (5,9 ms a 2,5 kV). Las bacterias entonces se cultivaron durante 1 h a 37 °C en 1 ml de caldo SOC y después se cultivaron sobre placas de LB que contienen trimetoprima (100 µg/ml). La expresión de los genes *red* llevada a cabo por pAJD434 se indujo añadiendo L-arabinosa al 0,2 % al medio. La delección génica del gen *tolR* se confirmó mediante amplificación de ADN genómico por PCR usando los pares de cebadores UpF /Kan-R; Kan-F/Kan-R; Kan-F/DownR. La delección también se confirmó usando los cebadores tolR-F (CGGACCCGTATTCTTAAC) (SEQ ID NO: 74) y tolR-R (GCCTTCGCTTTAGCATCT) (SEQ ID NO: 75) hibridando posteriormente aguas arriba y aguas abajo de las regiones flanqueantes 5' y 3', respectivamente.

4) Construcción del mutante de delección BL21(DE3) ΔompA:

50 El mutante ΔompA se produjo sustituyendo la secuencia de codificación de ompA con un casete de resistencia al cloranfenicol ("Cmr") usando cebadores específicos. El procedimiento es el mismo que el utilizado para producir BL21(DE3)ΔtolR (véase la sección 3) anterior). En particular, los cebadores usados para amplificar las regiones de aproximadamente 530 pb aguas arriba y de aproximadamente 470 pb aguas abajo del gen *ompA* se amplificaron a partir de ADN genómico de BL21(DE3) con los pares de cebadores específicos ompA_Up dir: (GATCGGTTGGTTGGCAGAT) (SEQ ID NO: 76)/ompA cm_Up-inv: (CACCAGGATTTATTATTCTGCGTTTTTGCCTCGTTATCAT) (SEQ ID NÚM.: 77); ompA cm_Down dir:

(TACTGCGATGAGTGGCAGGCGCAGGCTTAAGTTCTCGTC) (SEQ ID NO: 78) / ompA Down inv: (AAAACTTGAAAGCGGTTGG) (SEQ ID NO: 79); CMr DIR: (CGCAGAATAAAATAATCCTGGTG) (SEQ ID NÚM.: 80)/ CMr INV: (CCTGCCACTCATCGCAGTA) (SEQ ID NO: 81). Finalmente, los tres fragmentos amplificados se fusionaron entre sí mezclando 100 ng de cada uno en una PCR que contiene los cebadores UpF/ompA inv.

- 5 El fragmento lineal obtenido, en el que el gen Cmr era flanqueado por las regiones corriente arriba y corriente abajo de *ompA*, se usó para transformar la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (vuelta electrocompetente mediante tres etapas de lavado en agua fría). Los mutantes de *ompA* se seleccionaron cultivando en placas bacterias transformadas sobre placas Luria-Bertani (LB) que contienen 20 ug/ml de Cloranfenicol.
- 10 La delección génica del gen *ompA* se confirmó mediante amplificación de ADN genómico por PCR usando cebadores que hibridan específicamente con el casete de Cmr (CMr DIR/CMr INV), u *ompA*_Up dir/ CMr INV, o usando cebadores específicos para *ompA* con el fin de verificar posteriormente la delección de este gen (*ompA* DIR: (ATGAAAAAGACAGCTATCGC) (SEQ ID NO: 82) / *ompA* INV: (TTAAGCCTGCGGCTGAGTT) (SEQ ID NO: 83).

5) Expresión de antígenos de *Chlamydia* sobre BL21(DE3) Δ tolR o sobre BL21(DE3) Δ ompA:

- 15 Para expresar los 9 antígenos de *Chlamydia muridarum* (TC0052, TC0106, TC0210, TC0313, TC0431, TC0551, TC0651, TC0727, TC0890) sobre la membrana externa de las cepas mutantes de *E. coli*, los genes que codifican los antígenos de *Chlamydia* se fusionaron en marco con el péptido líder OmpA de *E. coli*. Estas fusiones se insertaron después en pET 21b (Invitrogen), un plásmido previamente modificado para la clonación con el procedimiento pipe [198], usando cebadores específicos que se alinean con la secuencia de seis marcadores de histidina en el extremo
- 20 3' y con el gen que codifica el péptido líder OmpA de *E. coli* en el extremo 5'. Las fusiones se colocaron bajo el control de un promotor lac en el plásmido multicopia (pET). El plásmido obtenido se denomina pET-TC0xyz. Los plásmidos se transformaron en células *E. coli* HK 100, se hicieron competentes al CaCl_2 tras varios lavados sucesivos en soluciones frías de MgCl_2 y CaCl_2 [198].
- 25 Las células se laminaron en placas sobre LB conteniendo 100 ug/ml de Amp. a 37 °C hasta el día siguiente. Los clones positivos se cultivaron en LB para producir mini preparaciones de plásmidos (usando el kit mini prep de Qiagen).

Las cepas BL21(DE3) Δ tolR y BL21(DE3) Δ ompA de *E. coli* (vueltas electrocompetentes mediante tres etapas de lavado en agua fría) se transformaron con 10 ng de cada mini preparación de plásmido pET-TC0xyz. Las bacterias se cultivaron durante 1 h a 37 °C en 1 ml de caldo SOC y después se cultivaron en placas sobre placas LB que contienen Amp. (100ug/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C.

30 6) Preparación de VME:

- Las células de *E. coli* BL21(DE3) Δ tolR y BL21(DE3) Δ ompA que expresan o no expresan antígenos de *Chlamydia* se inocularon a partir de placas recién preparadas en 500 ml de LB (caldo Luria Bertani) + Amp (100 ug/ml) y se incubaron a 37 °C con agitación (200 r.p.m.) y se dejaron crecer. La inducción de la expresión de proteína recombinante se hizo mediante la adición de IPTG 0,1 mM a D.O.=0,4. El cultivo bacteriano se dejó crecer hasta que a 37 °C la D.O.=1. A
- 35 ese punto, los medios de cultivo se filtraron a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 μm (Millipore, Bedford, MA). Los filtrados se sometieron a centrifugación de alta velocidad (200.000 x g durante 90 min), y los sedimentos conteniendo las OMV se lavaron con PBS y finalmente se resuspendieron con PBS [199].

7) Análisis por transferencia de Western:

- 20 ug de preparaciones de OMV y 200 ng de TC0210 His se separaron por tamaño respectivamente mediante SDS-PAGE (gel al 4-12 %) en condiciones reductoras y se sometieron a electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se saturaron durante toda la noche con leche Marwell al 10 % en PBS (tampón fosfato) y Tritón al 0,1 %, agitando a 4 °C. Después, las membranas se incubaron con suero de ratón específico a TA durante 2 horas (dilución de suero 1:200). Una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amersham Bioscience) se usó como el anticuerpo secundario. La tinción colorimétrica se realizó con el kit de sustrato Opti 4CN
- 45 (Bio-Rad).

8) Ensayo de ELISA:

- Las IgG dirigidas a TC0210 recombinante purificada se ensayaron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los pocillos individuales de placas de micro-ELISA (Nunc Maxisorp) se recubrieron con 1 μg de proteína recombinante en PBS (a pH 7,4) a 4 °C durante toda la noche. Las placas se lavaron, se trataron durante 1
- 50 hora a 37 °C con PBS-BSA al 1%, y se añadieron a los pocillos 100 μl de alícuotas de antisuero a diferentes soluciones seriadas en PBS-Tween al 0,1 %. Tras la incubación durante 2 horas a 37 °C, las placas se lavaron de nuevo y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) diluida a 1:2500 en PBS-Tween. A continuación, se añadieron 100 μl de PNPP (Sigma) a las muestras y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las densidades ópticas se leyeron a 405 nm y los títulos de anticuerpo sérico se
- 55 definieron como la dilución en suero que produce un valor de DO de 0,5.

9) Ensayo de neutralización:

Los sueros obtenidos mediante inmunización de los ratones (BALB/c o CD1) con OMV-TC0210 se ensayaron *in vitro* para la actividad de neutralización. Los ensayos de neutralización *in vitro* se realizaron sobre cultivos de células epiteliales LLC-MK2 (riñón de mono Rhesus). Tres diluciones seriadas de cada grupo de sueros se ensayaron mediante su dilución a 1:30, 1:90, 1:270 en tampón fosfato sacarosa (SP). También, los CE de *C. muridarum* infecciosos purificados se diluyeron en el mismo tampón para contener $3 \times 10^{(5)}$ IFU/ml, y se añadieron 15 μ l de suspensión de CE a cada dilución de suero en un volumen final de 150 μ l. Se permitió la interacción anticuerpo-CE mediante incubación durante 30 min a 37 °C. También, se incubaron los CE sin sueros como un control de la infección. 100 μ l de cada mezcla de reacción, incluyendo CE diluidos en SP sin sueros, se usaron para inocular las monocapas confluentes de LLC-MK2 (por duplicado para cada dilución de suero) en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos, y se centrifugaron a 2000g durante 1 hora a 37 °C. Tras la centrifugación, se añadió el medio esencial mínimo de Eagle que contiene las sales de Eagle, suero bovino fetal al 10 % y 1 μ g/ml de cicloheximida. Los cultivos infectados se incubaron a 37 °C durante 24 horas, mientras que en los ensayos de neutralización, en los que se usaron para la infección CE de *C. trachomatis*, los cultivos infectados se incubaron durante 48 horas. A continuación, los cultivos celulares se fijaron añadiendo 100 μ l de metanol durante 5 minutos y las inclusiones de *Chlamydia* se detectaron mediante tinción con un anticuerpo monoclonal anti-*Chlamydia* de ratón conjugado con fluoresceína (*Chlamydia* Merifluor, Meridian Diagnostics, Inc.). Finalmente, todas las inclusiones para cada pocillo se contaron con una magnificación de 10x.

Los cálculos de la reducción de la infectividad mediante cada grupo de sueros se llevaron a cabo usando títulos de neutralización de sueros preinmunológicos como niveles basales.

10) Mapeo de epítomos:

Sobre una membrana de nitrocelulosa, se detectaron 95 péptidos sintéticos de TC0210. Cada péptido está constituido por 15 aminoácidos y se solapa en 10meros con el siguiente péptido. Tres membranas, hechas con el mismo diseño, se lavaron con TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM) que contiene el 0,05 % de tween 20 (T-TBS), y después se incubaron toda la noche a 4 °C con leche Marwell al 2 % en TBS (MBS). A continuación, sobre las tres membranas, se ensayaron respectivamente diferentes grupos de sueros (dilución de los sueros a 1:100): sueros de ratones inmunizados con a) VME que expresa TC0210, b) TC0210His, y c) VME sola.

Finalmente, una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences) se usó como el anticuerpo secundario (dilución de sueros a 1:5000). La tinción colorimétrica se realizó con el kit de sustrato Opti 4CN (Bio-Rad).

Ejemplo 2: Construcción de un mutante de delección BL21(DE3) Δ tolR de *E. coli*

BL21 (DE3) Δ tolR es una cepa mutante de *E. coli* en la que la mutación Δ tolR se introdujo sustituyendo la secuencia de codificación tolR con un casete de resistencia a la kanamicina. Esta cepa es capaz de liberar una gran cantidad de vesículas de membrana externa en el sobrenadante del cultivo. Se descubrió que el contenido proteico liberado en el sobrenadante de cultivo de la cepa mutante Δ tolR es mayor en comparación con el liberado a partir de la cepa de tipo silvestre (véase la Figura 2).

Ejemplo 3: Expresión de antígenos de chlamydia en BL21(DE3) Δ tolR o en BL21(DE3) Δ ompA

Para permitir la presentación de cada uno de los 9 antígenos de *Chlamydia muridarum* (TC0052, TC0106, TC0210, TC0313, TC0431, TC0551, TC0651, TC0727 y TC0890 - véase la Tabla 3 a continuación) sobre la membrana externa de las cepas mutantes de *E. coli*, los genes que codifican los antígenos de *Chlamydia* se fusionaron en marco con el péptido líder OmpA de *E. coli*.

TABLA 3:

Antígenos de <i>Chlamydia</i> prometedores		
C. muridarum	COMENTARIO	Homólogo de <i>C. trachomatis</i>
TC0052	PPME	CT681
TC0651	proteína hipotética	CT372
TC0727	PME de 60 Kda rica en cisteína	CT443
TC0210	DO serina proteasa	CT823

Antígenos de <i>Chlamydia</i> prometedores		
C. muridarum	COMENTARIO	Homólogo de <i>C. trachomatis</i>
TC0313	proteína hipotética	CT043
TC0106	proteína hipotética	CT733
TC0551	NADH-quinona reductasa translocadora de Na(+)	CT279
TC0431	Proteína MAC-Perforina	CT153
TC0890	Fosfatasa de la familia de repetición de invasina	CT601

Las fusiones se colocaron bajo el control de un promotor *lac* en el plásmido multicopia pET21b+ (Novagen). El plásmido obtenido se denomina pET-TC0xyz.

- 5 Los 9 plásmidos pET-YC0xyz diferentes se transformaron en cepas de *E. coli* BL21(DE3) Δ tolR y *E. coli* BL21(DE3) Δ ompA 4. El análisis en gel SDS PAGE en la Figura 3 muestra que la expresión del antígeno de *Chlamydia* fue claramente visible en los extractos totales de cultivo de *E. coli* BL21(DE3) Δ tolR que expresan TC0106, TC0052 y TC0210 (véanse los carriles 1, 2 y 4 de la Figura 3). Al contrario, la expresión de TC0727 en *E. coli* no fue claramente visible (véase el carril 3 de la Figura 3).

Ejemplo 4: Preparación de OMV

- 10 En la Figura 4 se muestra un diagrama esquemático de la preparación de OMV. Las bacterias se indujeron cuando alcanzaron una DO600 de 0,4. Las bacterias se cultivaron hasta una DO600 = 1 y después se centrifugaron a 6.000g. Los medios de cultivo de las cepas BL21(DE3) Δ tolR y pET-TC0xyz BL21(DE3) Δ tolR se filtraron a través de un filtro de 0,22 μ m, se centrifugaron a alta velocidad (200.000 x g, 120 min.) y se recuperaron las OMV en el sedimento, se lavaron con fosfato y después se resuspendieron en fosfato para obtener las OMV [199].

Ejemplo 5: Análisis de las preparaciones de VME

- Se usó análisis por Western blot para determinar si las preparaciones de OMV expresaban los antígenos heterólogos. Seis de las nueve VME recombinantes demostraron llevar las proteínas heterólogas. Las Figuras 5A y 5B muestran que cada una de las TC0052, TC0106, TC0210, TC0727, TC0313 y TC0890 se expresaron en las OMV recombinantes. Al contrario, la Figura 5C muestra que TC0651, TC0551 y TC0431 no se expresaron en las VME recombinantes.

- 20 Sin embargo, en los experimentos de seguimiento, TC0431 demostró, de hecho, que se expresaba en las OMV recombinantes pero a un bajo nivel al que se puede observar en la Figura 5D (i) en la que la cantidad de preparaciones de OMV cargada en el gel se duplicó para obtener niveles detectables del antígeno. Por otra parte, la expresión de TC0052 no se detectó en los experimentos de seguimiento (véase la Figura 5D (ii)). Se cree que la razón para esta aparente variabilidad es resultado de la inestabilidad de las cepas diseñadas genéticamente que codifican TC0052, llevando esta inestabilidad a la lisis de las bacterias durante el crecimiento en el cultivo.

- La curva de crecimiento de *E. coli* BL21(DE3) Δ tolR preparada en el Ejemplo 3 que expresa cada uno de los 9 antígenos de *Chlamydia* se muestra en la Figura 6. La *E. coli* que expresa TC0210 tuvo la tasa más grande de crecimiento. La tasa de crecimiento de *E. coli* que expresa TC0313, TC0890, TC0431 o TC0106 fue similar pero fue más lenta que la tasa de crecimiento de *E. coli* que expresa TC0210. La tasa de crecimiento de *E. coli* que expresa TC0727 fue más lenta que la *E. coli* que expresa cualquiera de TC0313, TC0890, TC0431 o TC0106. La *E. coli* que expresa TC0052, TC0551 o TC0651 tuvo la tasa de crecimiento más lenta.

- Se ha descubierto que TC0210-OMV fue la mejor preparación en términos de producción y cantidad de antígeno de *Chlamydia* expresados. La espectrometría de masas confirmó la presencia del péptido TC0210 sobre la superficie de preparaciones de TC0210-VME tras el rasurado de la misma preparación de VME (la técnica del rasurado de *Chlamydia* se describe en el documento WO 2007/110700 y se muestra un diagrama esquemático en la Figura 7). El péptido identificado en el experimento de rasurado se corresponde con los aminoácidos 65-75 de la proteína TC0210 de longitud completa. El péptido que coincide se muestra en negrita y subrayado (véase también la Figura 8):

1 MMKRLLCVLL STSVFSSPML GYSAPKKDSS TGICLAASQS DRELSQEDLL
51 KEVSRGFSKV AAQATPGVVY IENFPKIGSQ AIASPGNKRK FQENPFDFYN
101 DEFFNRFFGL PSHREQRPQ QRDAVRGTGF IVSEGGYVVT NHHVVEDAGK
151 IHVTLHDGQK YTAKIIGLDP KTDLAVIKIQ AKNLPFLTFG NSDQLQIGDW
201 SIAIGNPFGL QATVTVGVIS AKGRNQLHIV DFEDFIQTDA AINPGNSGGP
251 LLNIDGQVIG VNTAIVSGSG GYIGIGFAIP SLMAKRVIDQ LISDGQVTRG
301 FLGVTLPID SELAACYKLE KVGALITDV VKGSPAEEKAG LRQEDVIVAY
351 NGKEVESLSA LRNAISLMMP GTRVVLKVVV EGKFIEIPVT VTQIPAEDGV
401 SALQKMGVRV QNLTPEICKK LGLASDTRGI FVVSVEAGSP AASAGVVPQG
451 LILAVNRQRV SSVEELNQVL KNAKGENVLL MVSQGEVIRF VVLKSDE

TC0210 tiene las propiedades que se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

TC0210					
Antígeno de <i>C. muridarum</i> / <i>C. trachomatis</i>	C. C.	% de similitud de <i>C. muridarum</i> / <i>C. trachomatis</i>	Nombre de la proteína / comentario	Datos científicos de Novartis	Otros datos de la bibliografía
TC0210/CT823		91,8	HtrA / DO serina proteasa	Superficie expuesta	Serina endoproteasa, la activación térmica muestra tanto las actividades de chaperona como de proteasa (Huston et al., FEBS Lett., 2007);
				Inductor de anticuerpos y CD4-th1 expuestos en superficie en ratones y seres humanos	
				Altamente homóloga entre los 8 serotipos principales	Inmunogénica en seres humanos (Sanchez-Campillo et al., Electrophoresis, 1999)

5

Un alineamiento de secuencia de TC0210 de *C. muridarum* con CT823 de *C. trachomatis* se proporciona en la Figura 9. La TC0210 es idéntica a la CT823 en el 93 %.

La Figura 10B muestra los resultados de un experimento de micromatriz de proteínas en el que los antígenos de *Chlamydia* se expresaron en *E. coli*, se purificaron por afinidad y se detectaron sobre portaobjetos de cristal en un formato de micromatriz. Los instrumentos y los protocolos fueron como los descritos en Bombaci, M. y col [200]. Los portaobjetos se inmunotifaron con cientos de sueros humanos diferentes y se midió la intensidad de tinción de cada zona. Se muestran las proteínas reconocidas con una intensidad de fluorescencia de más de 1000. Se usaron dos grupos de sueros humanos para cada antígeno: Sueros positivos en MIF (barra a mano izquierda) y sueros negativos en MIF (barra a mano derecha) (en donde "MIF" se refiere al ensayo de microinmunofluorescencia [201], que se usa para comprobar si los sueros de los pacientes contienen anticuerpos contra el patógeno (positivo en MIF) o no (negativo en MIF)).

El análisis de la microplaca de proteínas mostrado en la Figura 10B usando sueros positivos en MIF y negativos en MIF muestra que hay tres grupos de antígenos de *Chlamydia*: un grupo de antígenos se reconoce principalmente mediante suero positivo en MIF (CT681His, CT823His, CT443His, CT456GST, CT110GST, CT622His, CT089His), otro grupo se reconoce tanto por sueros positivos en MIF como por sueros negativos en MIF (CT415GST, CT119GST,

20

CT049GST, CT589GST, CT372GST, CT077His, CT559His, CT322His, CT316His, CT350GST, CT381His, CT355GST, CT389GST, CT127GST, CT157GST, CT567His y CT266His), y un tercer grupo de antígenos se reconoce principalmente mediante sueros negativos en MIF (CT470His, CT398His y CT114His). El antígeno CT823 se reconoce claramente mediante sueros positivos en MIF, pero no mediante sueros negativos en MIF, lo que sugiere que CT823 es un antígeno de *Chlamydia* capaz de generar una respuesta inmunitaria humoral durante infecciones naturales en el ser humano. Por lo tanto, CT823 es inmunogénico en seres humanos.

Esto se sostiene mediante la Figura 10A, que muestra que CT823 se expone sobre la superficie de CE (KS=19,1, véase la figura 10A). El ensayo se realizó tal como se describió anteriormente [196]. Se usó un suero de anticuerpos policlonales de ratón que se había preparado inmunizando ratones con TC0210His. Los sueros de control de fondo fueron de ratones inmunizados con proteínas contaminantes de *E. coli*. El desplazamiento entre el histograma de control de fondo y el histograma del ensayo del suero inmunológico se tomó como una medida de la unión de anticuerpos a la superficie de células de CE. La prueba de I.T de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para dos muestras se realizó sobre los dos histogramas solapados. El valor $D/s(n)$ (un índice de disparidad entre las dos curvas) se informa como la "puntuación de K-S". Se obtuvo una K-S de 19,1 (T(X) = 1146; valor de T max = 1719; diferencia máx. = 78,5 % a valor de 19,1; la confianza en la diferencia es mayor del 99,9%; porcentaje del EED positivo: 82,6; datos de comparación de la población 0,06)

La Figura 10C muestra que el antígeno CT823 es uno de los tres antígenos fuertemente reconocidos por los sueros de ratones inmunizados con los CE completos de *C. trachomatis*. Esto sugiere que la CT823 natural está contenida en los CE en una cantidad que es suficiente como para generar una respuesta de anticuerpos en ratones.

La HtrA recombinante y la HtrA natural contenida en los CE de *C. muridarum* también fueron reconocidas por un suero de anticuerpos policlonales de ratón que se había preparado mediante inmunización de ratones con una preparación de OMV de BL21(DE3)bToIR TC0210 tal como se muestra mediante Western Blot en la Figura 10D.

El análisis de FACS descrito anteriormente para la Figura 10A se repitió usando suero de anticuerpos policlonales de ratón obtenido de ratones inmunizados con la preparación de OMV de BL21(DE3)ΔToIR TC0210. Habiendo demostrado anteriormente en la Figura 10A que se puede usar citometría de flujo para seguir a los anticuerpos que se unen a la superficie de los CE, los datos presentados en la Figura 10E muestran que los anticuerpos policlonales generados contra TC0210 en el ámbito de las OMV fueron capaces de reconocer la HtrA expuesta sobre la superficie de los CE de *C. muridarum* (Figura 10E).

Ejemplo 6: Inmunización de ratones BALB con VME-TC0210:

Los ratones se inmunizaron de acuerdo con el cronograma mostrado en la Figura 11. Específicamente, los ratones BALB (5/6 semanas de vida) se inmunizaron por vía intramuscular en los días 1, 20 y 35 antes de que se tomaran las PBMC en el día 45 y se recogiese el suero en el día 60. Los ratones se dividieron en 5 grupos, con 12 ratones por cada grupo, y la inmunización se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente esquema: GRUPO 1: PBS + Alumbre; GRUPO 2: PBS + Alumbre + 5 µg de preparación de VME de *E. coli* BL21(DE3)ΔToIR; GRUPO 3: PBS + Alumbre + 5 µg de preparación de VME de BL21(DE3)ΔToIR TC0210; GRUPO 4: PBS + Alumbre + 50 µg de preparación de VME de BL21(DE3)ΔToIR; y GRUPO 5: PBS + Alumbre + 50 µg de preparación de VME de BL21(DE3)ΔToIR TC0210.

Análisis por transferencia de Western y ensayo de ELISA

Tras la inmunización de los ratones, los sueros de los ratones se probaron por análisis Western blot y ELISA con el fin de evaluar la producción de anticuerpos anti-TC0210. Para cada Western blot, se cargó la proteína recombinante TC0210 purificada de *C. muridarum*. La Figura 13 muestra que los sueros de ratones inmunizados con preparaciones de VME que expresan TC0210 fueron capaces de reconocer la proteína recombinante, mientras que los sueros de ratones inmunizados con preparaciones de VME sin TC0210 no lo fueron.

Los resultados de ELISA de la Figura 14 muestran que para los ratones inmunizados con 5 µg de OMV-TC0210 (ratones del Grupo 3), se generó una misma cantidad de anticuerpos IgG1 e IgG2a. Sin embargo, para los ratones inmunizados con 50 µg de VME-TC0210 (ratones del Grupo 5), se generaron más anticuerpos IgG2a que IgG1. La cantidad total de anticuerpos IgG generados fue aproximadamente la misma en ambos casos. Por lo tanto, la dosis de 50 µg funciona mejor en términos de calidad de los anticuerpos generados (tal como se muestra mediante el título de neutralización). Se generaron más anticuerpos IgG en ratones inmunizados con VME que expresan TC0210 que los generados en ratones inmunizados solo con VME + alumbre.

Neutralización de la infección con C.E. de *C. muridarum*.

Existen muchas evidencias que sustentan un rol importante para los anticuerpos neutralizantes en la protección frente a la infección por *Chlamydia*. Con el fin de evaluar esto, se realizó un ensayo de neutralización usando sueros de ratones inmunizados con la preparación de VME que expresa el antígeno TC0210 de *Chlamydia*. Los resultados se muestran en la Figura 15, que muestra el porcentaje de neutralización frente a la infección por *C. muridarum* con respecto a tres diluciones de sueros diferentes (media de seis experimentos independientes).

Los sueros de ratones inmunizados con 50 µg de OMV que expresan TC0210 (ratones del Grupo 5) son capaces de neutralizar *in vitro* la infección por *C. muridarum* con un título de 1:90 (el título de neutralización se define como la dilución de suero capaz de reducir la infección por CE al 50 %) (véase la línea (—■—)). Este suero es casi tan potente en la neutralización *in vitro* de *C. muridarum* como el suero obtenido mediante inmunización de ratones con MOMP recombinantes purificadas (control positivo - véase la línea (—◆—)). Por el contrario, los sueros de ratones inmunizados con TC0210 recombinante purificado no son capaces de neutralizar la infección por *C. muridarum*; de hecho, los porcentajes de neutralización son muy bajos también en la dilución mínima del suero (1:30) (véase la línea (—)). La línea (—▲—) muestra el porcentaje de neutralización en relación con la OMV sin antígenos de *Chlamydia*. Por lo tanto, el porcentaje de neutralización para la TC0210 recombinante purificada es muy similar al porcentaje de neutralización obtenido para la VME sola. Estos cálculos se han hecho frente a los sueros preinmunológicos. Este es uno de los primeros ejemplos en los que los anticuerpos dirigidos contra un antígeno de *Chlamydia*, que no sea PPME, han sido capaces de neutralizar *in vivo* la infectividad de *Chlamydia*. Sorprendentemente, estos datos muestran que el antígeno TC0210, que no es protector cuando se ensaya en un modelo animal de *Chlamydia* cuando se administra en su forma purificada, se vuelve protector cuando se presenta en una VME de la infección.

El ensayo de neutralización se repitió nuevamente y los resultados se muestran en la Figura 12. Los resultados en la Figura 12 mantienen los hallazgos tratados anteriormente.

Neutralización de la infección con C.E. de *C. trachomatis*

CT823 es la proteína de *C. trachomatis* homóloga a TC0210. Se ensayó la capacidad de los sueros anti-VME-TC0210 para neutralizar *in vitro* la infección por *Chlamydia trachomatis*.

Los CE purificados de *C. trachomatis* se incubaron con sueros de ratón a tres diferentes diluciones a 37 °C durante 30 minutos. La infectividad residual se determinó sobre células LLC-MK2 mediante recuento de IFU/cs. Los porcentajes de neutralización se midieron en dos ensayos de neutralización realizados de forma independiente y se calcularon frente a los sueros preinmunológicos. La Figura 16 muestra los resultados. El suero policlonal de ratón anti-OMV-TC0210 (véase la línea (—■—)) es capaz de neutralizar *in vitro* a *C. trachomatis* de manera eficaz (con un título similar observado infectando con C.E. de *C. muridarum*). De hecho, se ha descubierto que el suero policlonal de ratón anti-OMV-TC0210 era casi tan potente en la neutralización de la infectividad de *C. trachomatis* que los sueros de ratones inmunizados con MOMP de *C. trachomatis* (véase la línea (—◆—), que es el control positivo). El porcentaje de neutralización de este suero es también superior que el obtenido tras la inmunización con la proteína purificada recombinante homóloga de *C. trachomatis*, CT823 (véase la línea (—●—)). La línea (—◆—) representa el porcentaje de neutralización de los sueros inmunizados con MOMP de *C. muridarum*; este suero no neutraliza la infección por *Chlamydia*. Asimismo, los sueros de ratones inmunizados con OMV (véase la línea (—▲—)) o con TC0210His (véase la línea (—▲—)) no neutralizaron la infección por *Chlamydia*. se ha descubierto que el anticuerpo específico de OMV-TC0210 neutraliza *in vitro* la infección por *C. trachomatis* al mismo nivel observado para *C. muridarum*. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria aumentada contra el antígeno de *C. muridarum* también puede neutralizar la infección contra *C. trachomatis*.

Ejemplo 7: Inmunización de ratones CD1 con VME-TC0210:

Con el fin de confirmar los resultados de neutralización del Ejemplo 6, la inmunización se repitió en ratones CD1 (de 5-6 semanas de vida). Los grupos de ratones CD1 (5 ratones en cada grupo) se inmunizaron de acuerdo con el siguiente esquema de inmunización: Grupo 1: 50 µg VME + Alumbre; Grupo 2: 50 µg de VME-TC0210 + alumbre; Grupo 3: 20 µg de TC0210His + 50 µg de VME + alumbre; Grupo 4: 1 µg de TC0210His + 50 µg de VME + alumbre; Grupo 5: 1 µg de TC0210His + alumbre; Grupo 6: 20 µg de TC0210His + alumbre. El esquema también se diseñó para ensayar si existe un efecto adyuvante de VME (véase los grupos 3 y 4). Los ratones se inmunizaron en los días 1, 20 y 40. Los sueros se recogieron para el ensayo de neutralización el día 60 (véase la Figura 17A).

Comparación de la inmunogenicidad entre TC0210 expresado sobre la OMV y la forma recombinante.

Se realizaron Western blots usando suero de ratones inmunizados con 50 µg de OMV-TC0210 (Grupo 2) y suero de ratones inmunizados con 1 µg de TC0210His más 50 µg de OMV sin antígenos de *Chlamydia* (Grupo 4=, con el fin de comparar la inmunogenicidad entre TC0210 expresado sobre la OMV y la forma recombinante. Se estimó que la cantidad de antígeno de *Chlamydia* presente sobre la superficie de la OMV de *E. coli* era el 1 % del contenido total de las proteínas de *E. coli* (aproximadamente 0,5 µg de proteína de *Chlamydia* en 50 µg de OMV).

Los resultados de Western blot de la Fig. 17B muestran que los sueros de ratones inmunizados con OMV-TC0210 o con TC0210-His, producen anticuerpos contra el antígeno de *Chlamydia*. Sin embargo, tal como se muestra en la Fig. 17B, tras la inmunización de ratones con una combinación de 1 µg de TC0210-His más 50 µg de OMV que no expresa un antígeno de *Chlamydia*, la producción de anticuerpos contra TC0210 no es visible. En este caso, 1 µg de TC0210His sola es inmunogénica, pero 1 µg de proteína recombinante TC0210His en combinación con VME no es inmunogénica. Por lo tanto, parece que la presencia de las VME separadas inhiben la inmunogenicidad de la proteína purificada cuando se usa 1 µg de proteína purificada. Sin embargo, el uso de una menor concentración de proteína (0,5 µg de TC0210) expresada en el sistema de VME es inmunogénica. La combinación de 20 µg de TC0210His más 50 µg de VME es adecuada para generar la producción de anticuerpos.

Los resultados del Western blot de la Fig. 17C resaltan adicionalmente las diferencias entre los sueros producidos mediante inmunización con 50 ug de OMV-TC0210 y los sueros producidos mediante inmunización con 1 ug de TC0210-His más 50 ug de OMV. Los resultados del análisis por transferencia de Western de la Figura 17B y 17C muestran que solo los sueros de ratones inmunizados con VME-TC0210 producen anticuerpos contra este antígeno. Esto sugiere que el efecto neutralizante generado por los sueros obtenidos mediante inmunización con VME-TC0210 no están causados por un efecto adyuvante de las VME, pero sí por la capacidad de las VME para presentar TC0210 en su conformación y composición naturales.

Títulos de ELISA

La Figura 18 muestra el análisis cuantitativo de la producción de anticuerpos por ELISA. Las microplacas de ELISA se revistieron con 0,5 µg de TC0210His en PBS y se almacenaron a 4 °C durante hasta el día siguiente. Las placas se saturaron con PBS-BSA al 1% y entonces se añadieron a los pocillos los antisueros a diferentes diluciones seriadas en PBS-Tween al 0,1 %. Las placas se incubaron después con IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma). Tras esto, se añadieron a las muestras 100 µl de PNPP (Sigma). Las densidades ópticas se leyeron a 405 nm y el título de los anticuerpos séricos se definió como la dilución del suero que produce un valor de DO de 0,5. Los títulos de IgG de cada grupo de ratones inmunizados con OMV que expresa TC0210, o la proteína recombinante TC0210-His (1 µg o 50 µg) más OMV, o con TC0210-His (1 µg o 50 µg) solo.

De izquierda a derecha, las barras en la Figura 18 se corresponden con los Grupos de ratones 2, 3, 6, 5, 4 y 1, respectivamente.

Aunque los títulos de anticuerpo de los sueros de ratones inmunizados con OMV que expresa TC0210 son menores que los obtenidos con TC0210His o con la misma proteína recombinante + las OMV, los anticuerpos que están presentes en los sueros de ratones inmunizados con las OMV que expresan TC0210 son mejores en términos de actividad neutralizante (véase a continuación).

Aunque no se ha investigado todavía, es razonable que los resultados de ELISA hayan sido diferentes sin los CE de *Chlamydia* se han usado para el revestimiento, ya que estos incluyen TC0210 en su conformación natural, en lugar de la proteína recombinante tal como se usa en el presente experimento. De hecho, un recubrimiento con los CE permitiría la detección de anticuerpos generados contra epítomos conformacionales.

Ensayo de neutralización

La Figura 19 muestra la neutralización *in vitro* de la infectividad de *C. muridarum* sobre células LL-CMK2. Los CE purificados se incubaron con sueros de ratón a tres diferentes diluciones a 37 °C durante 30 minutos. La infectividad residual se determinó sobre células LLC-MK2 mediante conteo de IFU/cs. Los porcentajes de neutralización se midieron en seis ensayos de neutralización realizados de manera independiente usando suero de ratones CD1 inmunizados con 50 ug de OMV recombinante que expresa TC0210 (Grupo 2: ■), con 20 µg de proteína purificada por TC0210-His (Grupo 6:). Los sueros de ratones inmunizados solo con OMV (Grupo 1: ▲) y con TC0210-His recombinante (1 µg) más OMV sola (Grupo 4: ◆), se incluyeron como controles negativos, mientras que los sueros de ratones inmunizados con MOMP recombinante (◆) se usaron como el control positivo. Los datos mostrados son las medias y las desviaciones típicas de las 12 muestras.

Se ha descubierto que los sueros de ratones inmunizados con OMV que expresa TC0210 (■) neutralizan la infección con *chlamydia muridarum* de manera tan eficiente como MOMP (◆), mientras que los sueros de ratones inmunizados con OMV sin antígeno de *chlamydia* o TC0210His no lo hacen.

También, los resultados de la neutralización indican que las OMV no tienen un efecto adyuvante. En su lugar, el resultado se debe a la capacidad de la VME-TC0210 recombinante para presentar el antígeno heterólogo en su conformación y composición natural.

Ejemplo 8: Análisis de la asignación de epítomos sobre TC0210

Los experimentos de asignación de epítomos se realizaron con el fin de verificar si había algunas diferencias en términos de epítomos lineales reconocidos entre los sueros de ratones inmunizados con OMV-TC0210 y sueros de ratones inmunizados con TC0210His. Se detectaron sobre tres membranas, 95 péptidos sintéticos solapantes que cubren la longitud completa del antígeno TC0210, respectivamente. Cada péptido está constituido por 15 aminoácidos y se solapa en 10meros con el siguiente péptido. Sobre las tres membranas, se ensayaron diferentes grupos de sueros: los sueros de ratones inmunizados a) con VME que expresa TC0210, b) con TC0210His, c) con VME sola (los sueros de ratones inmunizados con VME sin el antígeno de *Chlamydia* se usaron como control negativo), respectivamente. Se usó una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante como el anticuerpo secundario.

La Figura 20 muestra que los sueros de ratones inmunizados con OMV que expresan TC0210 (membrana superior) reconocen diferentes epítomos en comparación con los sueros de ratones inmunizados con proteína purificada recombinante TC0210His (membrana intermedia). Los sueros de ratones inmunizados con VME-TC0210 reconocieron los siguientes epítomos con alta especificidad: DYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 36). Los sueros de ratones inmunizados con VME-TC0210 reconocieron los siguientes epítomos con especificidad media: SHREQ (SEQ ID NO:

37), ALQKMGVRVQNLTPE (SEQ ID NO: 38) y NQVLKNAKGENVLLM (SEQ ID NO: 39). Los sueros de ratones inmunizados con VME-TC0210 reconocieron los siguientes epítomos con baja especificidad: SPMLGYSAPKKDSSTGICLA (SEQ ID NO: 40); EDLLKEVSRGFSKVAAQATP (SEQ ID NO: 41); TGSQAIASPGNKRGFQENPF (SEQ ID NO: 42); PRPQQRDAVR (SEQ ID NO: 43),
 5 IAIGNPFLQATVTVGVISAKGRNQLHIVD (SEQ ID NO: 44) y NTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMAKRVIDQL (SEQ ID NÚM.: 45).

Los sueros de ratones inmunizados con TC0210His reconocieron los siguientes epitopos con alta especificidad: NKRGFQENPFDFYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 84). Los sueros de ratones inmunizados con TC0210His reconocieron los siguientes epítomos con especificidad media: SHREQ.

10 El epitopo GENVLLMVSQGEVIR (SEQ ID NÚM.: 55) indicado dentro del recuadro sobre la membrana de OMV-TC0210 de la Figura 20 es el mismo epitopo hallado en la rasuración sobre los E.B. de *C. trachomatis* (véase GENVLLMVSQGDVVR (SEQ ID NÚM.: 86 en la presente solicitud), que se corresponde con la SEQ ID NÚM.: 43 del documento WO 2007/110700, Novartis Vaccines and Diagnostics, SRL), mientras que el epitopo TPGVVYIENFPK (SEQ ID NÚM.: 85), indicado en el otro recuadro para la membrana de VME-TC0210, es el mismo que el epitopo
 15 hallado en la rasuración sobre la preparación de VME-TC0210 que se describe en el Ejemplo 5.

Se sostiene la hipótesis de que los sueros producidos mediante inmunización con OMV-TC0210 y los sueros producidos mediante inmunización con TC0210 son capaces de reconocer los epitopos que coinciden en CT823. Por lo tanto, se hipotetiza que los sueros de ratones inmunizados con VME-TC0210 presumiblemente reconocerían el
 20 siguiente epítomo de CT823 con alta especificidad: DYFNDEFFNRFFGLP (SEQ ID NO: 56). Los sueros de ratones inmunizados con VME-TC0210 presumiblemente reconocerían los siguientes epítomos de CT823 con especificidad media: SHREQ (SEQ ID NO: 57), ALQKMGVRVQNITPE (SEQ ID NO: 58) y NQVLKNSKGENVLLM (SEQ ID NO: 59). Los sueros de ratones inmunizados con VME-TC0210 presumiblemente reconocerían los siguientes epítomos de CT823 con baja especificidad: SPMLGYSASKKDSKADICLA (SEQ ID NO: 60), EDLLKEVSRGFSRVAQATP (SEQ ID
 25 NO: 61), TGNQAIASPGNKRGFQENPF (SEQ ID NO: 62), IAIGNPFLQATVTVGVISAKGRNQLHIVD (SEQ ID NO: 63) y NTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMAKRVIDQL (SEQ ID NO: 64). Los sueros de ratones inmunizados con TC0210-His presumiblemente reconocerían los siguientes epítomos de CT823 con alta especificidad: DYFNDEFFNRFFGLP. Los sueros de ratones inmunizados con TC0210-His presumiblemente reconocerían los siguientes epítomos de CT823 con especificidad media: SHREQ (SEQ ID NO: 57).

30 **Ejemplo 9: Aumento de la cantidad de proteínas de la membrana externa sobre la VME**

OmpA se implica en el mantenimiento estructural del sistema de membranas. Probablemente por este motivo, la ausencia de esta proteína desestabiliza la membrana externa bacteriana, dando como resultado la liberación de una abundante cantidad de VME. En este caso, se observó la liberación de VME en el sobrenadante de cultivo de la cepa mutante BL21(DE3) Δ ompA. La preparación de VME se hizo tal como se ha descrito anteriormente y se muestra en el
 35 diagrama esquemático de la Figura 7. La rasuración se realizó sobre las VME con el fin de analizar su calidad. Los resultados se presentan en la Figura 21. Las 29 proteínas (todas proteínas de la membrana externa) identificadas en la VME de *E. coli* BL21(DE3) Δ ompA en el análisis del rasurado y de espectrometría de masas son: Precursor de lipoproteína hipotética yiaD [Escherichia coli CFT073], canal de transporte [Escherichia coli W3110], chaperona periplásmica [Escherichia coli K12], Posible toxina de sistema toxina-antitoxina regulado osmóticamente asociada con la muerte celular programada [muerte celular de Escherichia coli [Escherichia coli CFT073], lipoproteína mureína [Escherichia coli K12], peptidil-prolil cis-trans isomerasa de tipo FKBP (rotamasa) [Escherichia coli K12], proteína hipotética b0177 [Escherichia coli K12], proteína hipotética ECP_0753 [Escherichia coli 536], precursor de maltoproteína [Escherichia coli K12], canal de nucleósido, receptor de fago T6 y colicina K [Escherichia coli K12], lipoproteína de membrana externa asociada a peptidoglicano [Escherichia coli K12], precursor de lipoproteína 34 [Escherichia coli CFT073], proteína de andamiaje para la maquinaria de síntesis de mureína [Escherichia coli K12], lipoproteína menor [Escherichia coli K12], lipoproteína predicha [Escherichia coli K12], precursor de lipoproteína de membrana externa slyB [Escherichia coli CFT073], proteína X de membrana externa [Escherichia coli K12], proteína periplásmica de regulación de maltosa Escherichia coli K12], proteína periplásmica de transporte ABC de maltosa [Escherichia coli K12], precursor de lipoproteína hipotética yajG [Escherichia coli CFT073], transportador de ácidos
 50 grasos de cadena larga de membrana externa [Escherichia coli K12], precursor de proteína hipotética ybaY [Escherichia coli CFT073], lipoproteína de membrana externa predicha [Escherichia coli K12], precursor de proteína de translocación TolB [Escherichia coli K12], proteína hipotética b3147 [Escherichia coli K12], transportador predicho de hierro de membrana externa [Escherichia coli K12], subunidad de transportador de oligopéptidos [Escherichia coli K12], proteína hipotética c4729 [Escherichia coli CFT073], proteína hipotética b1604 [Escherichia coli K12].

55 Inesperadamente, se ha descubierto que todas las proteínas presentes en esta nueva preparación de OMV son proteínas de membrana externa. Este resultado resalta que la calidad de la nueva preparación de VME es mejor que la obtenida de la cepa mutante *E. coli* BL21(DE3) Δ tolR, en la que también se hallaron algunas proteínas citoplásmicas. Específicamente, en la cepa mutante *E. coli* BL21(DE3) Δ tolR, solo aproximadamente el 75 % de las 100 proteínas de VME eran proteínas de la membrana externa.

Ejemplo 10: Expresión de antígenos de *Chlamydia* en la cepa mutante BL21(DE3) Δ ompA-.

Los antígenos de *Chlamydia* se expresaron en la cepa *E. coli* BL21(DE3) Δ ompA con el fin de verificar si hay un aumento en la cantidad de antígenos de *Chlamydia* en la OMV recombinante derivada.

Las OMV se prepararon a partir de sobrenadantes de cultivo de la cepa BL21(DE3) Δ ompA que expresa TC0210 tal como se describe anteriormente y como se muestra en el diagrama esquemático de la Figura 4. Se cargaron diferentes cantidades de cada preparación de VME en gel de poli(acrilamida) al 4-12 %.

Tal como se muestra en la Figura 22, en estas nuevas preparaciones de OMV de la cepa BL21(DE3) Δ ompA, fue posible identificar la presencia de TC0210 directamente sobre SDS PAGE (datos confirmados mediante análisis de espectrometría de masas - véase la banda indicada con la flecha sobre la Figura 22). La banda de TC0210 es claramente visible a todas las concentraciones. Por el contrario, las preparaciones de VME obtenidas a partir de la cepa mutante *E. coli* BL21(DE3) Δ tolR, se observó la presencia de TC0210 solo mediante análisis por transferencia de Western. Esto confirma que la cantidad de antígeno de TC0210 expresado aumenta notablemente en la cepa BL21(DE3) Δ ompA en relación con la cepa mutante BL21(DE3) Δ tolR. La espectrometría de masas confirmó la presencia del péptido TC0210 sobre las preparaciones de TC0210-VME (Figura 23). Los péptidos identificados se muestran en negrita. Específicamente, se identificaron los siguientes péptidos: VAAQATPGVVYIENFPK (SEQ ID NÚM.: 46), GFQENPFDFYNDEFFNRRFFGLPSHREQRPQQR (SEQ ID NO: 47), GTGFVSEDGYVVTNHHVVEDAGK (SEQ ID NO: 48), TDLAVIKIAK (SEQ ID NO: 49), VIDQLISDGQVTR (SEQ ID NO: 50), AGLRQEDVIVAYNGKEVESLSALR (SEQ ID NO: 51), FIEIPVTVTQIPAEDGVVSALQK (SEQ ID NO: 52), VQNLTPICK (SEQ ID NO: 53), y NAKGENVLLMVSQGEVIR (SEQ ID NÚM.: 54).

Los inventores han descubierto inesperadamente que las cepas mutantes BL21(DE3) Δ ompA generaron una cantidad elevada de antígeno heterólogo sobre sus OMV en relación con las cepas OmpA de tipo silvestre. OmpA es la proteína más abundante sobre la membrana externa de *E. coli*. Los inventores han descubierto que, en la VME, la delección de esta proteína mejora la abundancia relativa del antígeno de *Chlamydia* con respecto a las proteínas de la membrana externa de *E. coli*.

Esta elevada cantidad de antígeno de *Chlamydia* expresada sugiere que las OMV de cepas Δ ompA, por ejemplo, BL21(DE3) Δ ompA-TC0210, son buenos candidatos para generar anticuerpos neutralizantes en ratones.

SECUENCIA**SEQ ID NÚM.:1: secuencia de proteína CT823**

```
MMKRLLCVLLSTSVFSSPMLGYSSASKKDSKADICLAVSSGDQEVSQEDLLKEVSRGFSRVAAKATPGVVYI
ENFPKIGNQAIASPGNKRGFQENPFDFYNDEFFNRRFFGLPSHREQRPQQRDAVRGTGFI VSEDGYVVTNH
HVVEDAGKIHVTLHDGQKYTAKIVGLDPKTDLAVIKIQAEKLPFLTFGNSDQLQIGDWAIAIGNPFGLQAT
VTVGVISAKGRNQLHIVDFEDFIQTDAAINPGNSGGPPLNINQVIGVNTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMA
KRVIDQLISDGQVTRGFLGVTLQPIDSELATCYKLEKIVYALVTDVVGSPAEEKAGLRQEDVIVAYNGKEV
ESLSALRNAISLMMPGTRVVLKIVREGKTI EIPVTVTQIPTEDGVVSALQKMGVVRVQNITPEICKKLGLAAD
TRGILVVAVEAGSPAASAGVAPGQLILAVNRQRVASVEELNQVLKNSKGENVLLMVSQGDVVRFIVLKSDE
```

SEQ ID NÚM.:2: secuencia de nucleótidos CT823

```
ATGATGAAAAGATTATTATGTGTGTGCTATCGACATCAGTTTTCTCTTCGCCAATGCTAGGCTATAGTGC
GTCAAAGAAAGATTCTAAGGCTGATATTTGTCTTGCAGTATCCTCAGGAGATCAAGAGGTTTCACAAAGAA
ATCTGCTCAAAGAGTATCCCGAGGATTTCTCGGGTCGCTGCTAAGGCAACGCCTGGAGTTGTATATATA
GAAAATTTTCTTAAACAGGGAACAGGCTATTGCTTCTCCAGGAACAAAGAGGCTTTCAAGAGAACCC
TTTTGATTATTTTAAATGACGAATTTTAAATCGATTTTTTGGATTGCTTCGCATAGAGAGCAGCAGCGTC
CGCAGCAGCGTGATGCTGTAAGAGGAACCTGGGTTTCATTGTTTCTGAAGATGGTTATGTTGTTACTAACCAT
CATGTAGTGCAGGATGCAGGAAAAATTCATGTTACTCTCCACGACGACAAAAATACACAGCTAAGATCGT
GGGTTTAGATCCAAAAACAGATCTTGCTGTGATCAAAATTCAGCGGAGAAATTACCATTTTGTAGCTTTTG
GGAATTCATGATCAGCTGCAGATAGGTGACTGGGCTATTGCTATTGGAATCCTTTTGGATTGCAAGCAACG
GTCAGTGTGCGGGTCATTAGTGCTAAAGGAAGAAATCAGCTACATATTGTAGATTTTGAAGACTTTATTCA
AACAGATGTCGCATTAACTCCTGGGAATTCAGGCGGTCCATTGTTAAACATCAATGGTCAAGTTATCGGGG
TTAATACTGCCATTGTGCTAGTGGTAGCGGGGATATATTGGAATAGGGTTTGTCTATTCCTAGCTTGATGGCT
AAACGAGTCATTGATCAATTGATTAGTGTAGTGGCAGGTAAACAGAGGCTTTTGGGAGTTACCTTTGCAACC
GATAGATTCTGAATTGGCTACTTGTACAAATTGGAAGAGTGTACGGAGCTTTGGTGACGGATGTTGTTA
AAGTTTCTCAGCAGAAAAAGCAGGGCTGCGCAAGAGATGTCATTGTGGCTTACAATGGAAGAAAGTA
GAGTCTTTGAGTGCCTTGCCTAATGCCATTTCCCTAATGATGCCAGGGACTCGTGTTGTTTTAAAAATCGT
TCGTGAAGGGAACAAATCGAGATACCTGTGACGGTTACACAGATCCCAACAGAGGATGGCGTTTCAGCGT
TGCAGAAGATGGGAGTCCGTGTTTCAACATTACTCCAGAAATTTGTAAGAACTCGGATTGTCAGCAGAT
ACCGGAGGATTTCTGGTAGTTGCTGTGAGGAGGCTGCGCTGCAGCTTCTGCAGGCGTCGCTCCTGGACA
GCTTATCTTAGCGGTGAATAGGCAGCGAGTTCGCTTCCGTTGAAGAGTTAAATCAGGTTTTGAAAACTCGA
AAGGAGAGAAATGTTCTCCTTATGTTTCTCAAGGAGATGTGGTGCGATTTCATCGTCTTGAATCAGACGAG
TAG
```

SEQ ID NO: 3 - Secuencia de nucleótidos de CT733

ATGTTAATAAACTTTACCTTTTCGCAACTGTCTTTTGTTCCTTGTACACTGTCTAGTGTCCCTGTTTTCTC
 AGCACCTCAACCTCGCGGAACGCTTCTTAGCTCGACCACAAAATTGGATCAGAAGTTTGGATTGAACAAA
 AAGTCCGCCAATATCCAGAGCTTTTATGGTTAGTAGAGCCGCTCTACGGGAGCCTCTTTAAATCTCCT
 TCAGGAGCCATCTTTTCTCCAACATTATCCAAAAAAGGTCCCTGCTTTTCGATATCGCAGTGCAGCTTT
 GATTCACTTACATTATTAATCCAGGGTTCGCCCAAGCCTATGCTCAACTGATCCAACACAGACCAGCG
 AATCCCTCTAACATTTAAGCAATTCCTTGCAATTGCATAAGCAATTAACCTATTTTTAAATCCCCCTAAG
 GAATTTTATGACTCTGTTAAAGTGTTAGAGACAGCTATCGTCTTACGTCACTTAGGCTGTTCAACTAAGGC
 TGTTGCTGCGTTTTAAACCTTATTTCTCAGAAATGCAAAGAGAGGCTTTTTACACTAAGGCTCTGCATGTAC
 TACACACCTTCCAGAGCTAAGCCCATCATTTGCTCGCTCTCTCCGGAGCAGAAAACCTCTCTTCTCTCC
 TTGAGAAAATTGGCGAATTACGATGAGTTACTCTCGCTGACGAACACCCCAAGTTTTCAGCTTCTGTCTGC
 TGGGCGCTCGCAACGAGCTCTTTTAGCTCTGGACTTGTACCTCTATGCTTTGGATTCTGTGGAGAACAGG
 GGATGCTCTCTCAATCCACACAACTTCGCACCTCTACAGTCCATGTTGCAACAATACGCTACTGTAGAA
 GAGGCTTTTTCTCGTTATTTTACTTACCGAGCTAATCGATTAGGATTTGATGGCTCTTCTCGATCCGAGAT
 GGCTTTAGTAAGAATGGCCACCTTGATGAACCTTGTCTCCTTCCGAAGCTGCGATTTTAACCACAAGCTTCA
 AAACCTTCTTACAGAAGAAGCGGATACTTTGATCAATAGTTTCTATACCAATAAGGGCGATTCTGTTGGCT
 CTTTCTCTGCGAGGGTTGCCTACACTTGTATCCGAAGTACGCGAAGTCCCATGGCAATACCAATGACAGA
 AGCTCGATCTCAGCAAAATTTATGCAACTACCTATCGCTAGTAGTAAGAGTCTGAAAGCGCACAAAGAAA
 TGCTAAACAAGCAAAATCTTTCTAAGGAAATGTTTTAGATTCTCAGAACTGCAGCTTCTTGCCAAGGA
 TTGGATATCTTTTCCGAGAATGTCGCTGTTCAAATTCACCTTAAATGGAACGTTAGTATCCATTATATA

SEQ ID NÚM: 4 - Secuencia de proteína CT733

MLINFTRNCLLFVLTLSSVPVFSAPQPRGTLPSSTTKIGSEVWIEQKVRQYPELLWLVEPSSSTGASLKSP
 SGAIFSPTLFQKKVPAFDIAVRSLIHLHLIIQGSQAYAQLIQLQTSPLTFKQFLALHKQLTLFLNSPK
 EFYDSVKVLETAIVLRHLGCSKAVAAFKPYFSEMQRFAFYTKALHVLHTFPELSPSFARLSPEQKTLFFS
 LRKLANYDELLSLNTNPSFQLLSAGRSQRALLALDLIYALDSCGEQGMSSQFHTNFAPLQSMQQYATVE
 EAFSRYFTYRANRLGFDGSSRSEMAIIVRMATLMNLSPEAAIILTSFKTLPTTEADTLINSFYTNKGDSL
 LSLRGLPTLSELTRTAHGNNTNAEARSQIYATTLISLVVKSLLKAHKEMLNKQILSKEIVLDFSETAASCQG
 LDIFSENNAVQIHLNGTVSIHL

5

SEQ ID NÚM.:5: Secuencia de nucleótidos CT153

ATGACTAAGCCTTCTTTCTTATACGTTATTTCAACCTTTTTCCGTATTTAATCCACGATTAGGACGTTTCTC
 TACAGACTCAGATACTTATATCGAAGAAGAAAACCGCCTAGCATCGTTCATTGAGAGTTTGCCACTGGAGA
 TCTTCGATATACCTTCTTTTCATGGAACCGCGATTTCCAATAGCCCTATATTTTATCTTGGGAGACAAC
 AAAGACGGCGCTCTGTTCACTATTCTTGAACCCAACTCTCAGCTTGCGCAGCCACTTGCCCTGGTAGCCCC
 TTCTATACAAATGAATCCGATGCGGAGCTCCTAGAAGAAATTAAGCAAGCGTTATTACGAGCTCTCATG
 ACGGTGTGAAATATCGCATACCCAGAGAATCCTTCTCTCCAGAAAAGAAAACCTCTAAGGTTGCTCTAGTC
 GATGACGATATTGAATTGATTGCAATGTCGACTTTTTGGGTAGAGCTGTTGACATTGTCAAATTAGACCC
 TATTAATATTCTGAATACCGTAAGCGAAGAGAATATTCTAGATTACTCTTTTACAAGAGAAAACGGCTCAGC
 TGAGCGCGGATGGTCGTTTTGGTATTCTCCAGGGACTAAGCTATTCCTAAACCTTCTTTTGTAGTAGAA
 ATCAGTACCTCCATTTTGAAGAAACAACCTTCACTTACTCGAAGTTTTTCTGCATCGGTTACTTTTAGTGT
 ACCAGACTTCGCGGCGACTATGCTCTTTCAAAGCCCTCCCATGGTAGAAAATGGTCAAAAAGAAATTTGTG
 TCATTCAAAAACACTTATTCCCAAGCTACTCTCTAACTAGTCGATATTGTTAAACGATACAAAAGAGAG
 GCTAAGATCTTGATTAAACAAGCTTGCCCTTTGGAATGTTATGGCGACATCGGGCTAAAAGCCAAATCCTCAC
 CGAGGGAAGCGTACGCTAGACTTACAAGGATTCACAGAATCGAAGTACAATTACCAGATTCAAGTAGGAT
 CCCATACGATTGACGCTGTATTAATCGATATGGATATTTCCAAGATTCAATCCAAATCAGAACAAAGCTTAT
 GCAATTAGGAAAAATCAAAATCAGGCTTTCAACGTAGCTTGGATGACTATCATATTTATCAAATTGAAAGAAA
 ACAAACCTTTTTCTTTTCTCCGAAGCATCGCAGCCTCTCATCCACATCCCATTCCGAAGATTCTGATTTGG
 ATCTTTCTGAAGCAGCCGCTTTTCAGGAAGTCTTACCTGCGAGTTGTAAAAAAGCACTCAACATGCC
 AAGAATACCGTCACATGTTCCACAGCCGCTCATTCCCTATACACACTCAAAGAAGATGACAGCTCGAACCC
 CTCTGAAAAACGATTAGATAGTTGTTTCCGCAATTGGATTGAAAACAACTAAGCGCCAATTCTCCAGATT
 CCTGGTCAGCGTTTTATTCAAAAATTCGGAACACACTATATTGCATCAGCAACTTTGGAGGGATAGGTTTT
 CAAGTGCTCAAACTATCTTTTGAACAGGTGGAGGATCTACATAGCAAAAAGATCTCCTTAGAAACCGCAGC
 AGCCAACTCTCTATTAAGGTTCTGTATCCAGCAGCACAGAATCTGGATACTCCAGCTATAGCTCCACGT
 CTTCTTCTCATACGGTATTTTTAGGAGGAACGGTCTTACCTTCGGTTCATGATGAACGTTTAGACTTTAA
 GATTGGTCGGAAGTGTGCACCTGGAACCTGTTTCTATCCAGGTTTCTTTACAACCTATAACGAATTTACT
 AGTTCTCTCCATTTTCTTAATATCGGTGCTGCAGAGCTCTCTAATAAACGAGAATCTCTTCAACAAGCGA
 TTCGAGTCTATCTCAAAGAACATAAAGTAGATGAGCAAGGAGAACGTACTACATTACATCAGGAATCGAT
 AATCCTTCTTCTGGTTTACCTTAGAAGCTGCCACTCTCTCTTATAGTCAGTACTCTTACATTGCTTC
 GTGGTCTACGCTTCTCTATTTGTCCCAACATTAAGAGAAGCTTCTCGGCAACCCCTATCGTTTTCTATT
 TTTGTGTAGATAATAATGAACATGCTTCGCAAAAAATATTAAACCAATCGTATTGCTTCTCGGGTCTCTG
 CCTATTGCAAAAAATTTTTGGTAGCGAATTGCTAGTTTCCCCTATCTATCTTTCTATGGAAATGCAAA
 AGAGGCGTACTTTGATAACACGTACTACCAACGCGTGTGGGTGGATTGTTGAAAAGTTAAATACTACAC
 AAGATCAATTCTCCGGGATGGAGACGAGGTGCGACTAAAACATGTTTCCAGCGGAAAGTATCTAGCAACA
 ACTCCTCTTAAGGATACCCATGTTACACTACGCGTACAACGAAGTGTGAAGATGCTATCTTTATTATTAA
 AAAATCTTCAGGTTATTGA

SEQ ID NÚM.:6: secuencia de proteína CT153

MTKPSFLYVIQPFVFNRLGRFSTSDTYIEENRLASFIESLPLEIFDIPSFMETAISNSPYILSWETT
KDGALEFTEPKLSACAATCLVAPSIQMKSDAELLEIKQALLRSSHDGVKYRITRESFSPEKKTPKVALV
DDDIELIRNVDFLGRAVDIVKLDPINILNTVSEENILDYSFTRETAQLSADGRFGIPPGTKLFPPKPSFDVE
ISTSI FEETTSFTRSFASVTFVSPDLAATMPLQSPPMVENGQKEICVIQKHLFSPSYSPKLVDIVKRYKRE
AKILINKLAFGMLWRHRAKSQILTEGSRVLDLQGFTESKYNYQIQVGSHTIAAVLIDMDISKIQSKSEQAY
AIRKIKSGFQSRSLDDYHIYQIERKQTFSPKHRSLSSSTSHSESDLDLSEAAAFSGSLTCEFVKKSTQHA
KNTVTCSTAAHSLYTLKEDSSNPSEKRLDSCFRNWIENKLSANSPDSWSAFIQKFGTHYIASATFGGIGF
QVLKLSFEQVEDLHKKISLETAANSLLKGSVSSSTESGYSSYSSTSSSHTVFLGGTVLPVHDERLDFK
DWSESVHLEPVPIQVSLQPIITNLLVPLHFPNIGAAELSNKRESLQQAIRVYLKEHKVDEQGERTTFTSGID
NPSSWFTLEAAHSLIVSTPYIASWSTLPYLFPTLRERSSATPIVFYFCVDNNEHASQKILNQSYCFLGSL

PIRQKIFGSEFASFYPYLSFYGNAKEAYFDNTYYPTRCGWIVEKLNTTQDQFLRDGDEVRLKHVSSGKYLAT
TPLKDTHTGLTRTNCEDAIFIKKSSGY

SEQ ID NÚM.:7: secuencia de nucleótidos CT601

ATGCTCGCTAATCGCTTATTCTTAATAACCCCTTTTAGGGTTAAGTTCGTCTGTTTACGGCGCAGGTAAAGC
ACCGTCTTTGCAGGCTATTCTAGCCGAAGTCGAAGACACCTCCTCTCGTCTACACGCTCATCACAATGAGC
TTGCTATGATCTCTGAACGCCTCGATGAGCAAGACACGAACTACAGCAACTTTTCGTCAACACAAGATCAT
AACCTACCTCGACAAGTTCAGCGACTAGAAACGGACCAAAAAGCTTTGGCAAAAAACACTGGCGATTCTTTC
GCAATCCGTCCTCAAGATATTGGGTCTTCTGTACAAAATAAATTACAAGAAATCCAACAAGACAAAAAAAT
TAGCACAAAATTTGCGAGCGCTTCGTAACTCTTTACAAGCTCTCGTTGATGGCTCTTCTCCAGAAAATTAT
ATTGATTTCCTAACTGGTGAAACCCCGGAACATATTCATATTGTTAAACAAGGAGAGACCCCTGAGCAAGAT
CGCGAGTAAATATAACATCCCCGTCGTAGAAATTAATAAACTTAATAAACTAAATTCGGATACTATTTTTC
CAGATCAAAGAATTTCGCTTCCGAAAAAGAAATAG

SEQ ID NÚM.: 8 - Secuencia de proteína CT601

MLANRLFLITLLGLSSSVYGAGKAPSLQAILAEVEDTSSRLHAHHNELAMISERLDEQDTKLQQLSSTQDH
NLPRQVQRLQKALAKTLAILSQSVQDIRSSVQNKLEIQQEKKLAQNLRLRLNSLQALVDGSSPENY
IDFLTGETPEHIHIVKQGETLSKIASKYNIPVVELKKNLNSDTIFTDQIRIRLPKKK

SEQ ID NÚM.:9: secuencia de nucleótidos CT279

ATGGCATCCAAGTCTCGCCATTATCTTAATCAGCCTTGGTACATTATCTTATTCATCTTTGTTCTTAGTTT
AATTGCTGGTACCCCTCCTGTCTCTGTGTATTATGTCCTTGACCTATCCAACAGCAAGCTGCGGAATTTCG
ATCGCAATCAACAATGCTAATGGCTGCACAAGTAATTTCTTCCGATAACACATTCCAAGTCTATGAAAAG
GGAGATTGGCAGCCAGCCCTATATAATACTAAAAAGCAGTTGCTAGAGATCTCCTCTACTCCTCCTAAAGT
AACCGTGACAACCTTAAGCTCATATTTTCAAACTTTGTTAGAGTCTTGCTTACAGATACACAAGGAAATC
TTTCTTCATTGCAAGACCATAATCTCAATCTAGAAGAATTTTATCTCAACCAACTCCTGTAATACATGGT
CTTGCCCTTTATGTGGTCTACGCTATCCTACACAACGATGCAGCTTCCTCTAAATATCTGCTTCCCAAGT
AGCGAAAAATCCAACAGCTATAGAATCTATAGTTCTTCTATAGAAGGTTTGGTTTGTGGGGACCTATCT
ATGGATTCTTGTCTAGAAAAAGACGGGAATACTGTTCTTGGTACTTCTTGGTATCAACATGGCGAGACT
CCTGGATTAGGAGCAAATATCGCTAACCCCTCAATGGCAAAAAAATTCAGAGGCAAAAAAGTATTTCTAGT
CTCAGCTTCTGGAGAAACAGATTTTGCTAAGACAACCTAGGACTGGAAGTTATAAAAGGATCTGTATCTG
CAGCATTAGGAGACTCACCTAAAGCTGCTTCTTCCATCGACGGAATTCAGGAGCTACTTTGACTTGTAAT
GGTGTACCGAATCCTTCTCTATTCTCTAGCTCCCTACCGCGCTTTGTTGACTTCTTTCGCCAACTCTAA
ACCTAGTGGAGAGTCTCATGACCACTAA

SEQ ID NÚM.:10: secuencia de proteína CT279

MASKSRHYLNQPWYIILFIFVLSLIAGTLLSSVYYVLAPIQQQAAEFDRNQQLMAAQVISSDNTFQVYEK
GDWHPALYNTKKQLEISSTPPKVTVTTLSSYFQNFVRVLLTDTQGNLSSFEDHNLNLEEFLSQPTPVIHG
LALYVVYAILHNDAAASKLSASQVAKNPTAIESIVLPIEGFGLWGPYIGFLALEKDGNTVLGTSWYQHGET
PGLGANIANPQWQKNFRGKKVFLVSASGETDFAKTTLLGLEVIKGSVSAALGDSPKAASSIDGISGATLTN
GVTESFSHSLAPYRALLTFFANSKPSGESHDH

SEQ ID NÚM.:11: secuencia de nucleótidos CT443

ATGCGAATAGGAGATCCTATGAACAACTCATCAGACGAGCAGTGACGATCTTCGCGGTGACTAGTGTGGC
GAGTTTATTGCTAGCGGGGTGTTAGAGACCTCTATGGCAGAGTCTCTCTACAAACGTTATTAGCTTAG
CTGACACCAAGCGGAAAGACAACACTTCTCATAAAAGCAAAAAGCAAGAAAAACACAGCAAAAGAGACT
CCCGTAGACCGTAAAGAGGTTGCTCCGTTTCATGAGTCTAAAGCTACAGGACCTAAACAGGATTCTTGCTT
TGGCAGAAATGTATACAGTCAAAGTTAATGATGATCGCAATGTTGAAATCACACAAGCTGTTCTGAATATG
CTACGGTAGGATCTCCCTATCTATTGAAATTACTGCTACAGGTAAAAGGGATTGTGTTGATGTTATCATT
ACTCAGCAATTACCATGTGAAGCAGAGTTCGTACGCAGTGATCCAGCGACAACCTCTACTGCTGATGGTAA
GCTAGTTTGAAAAATTGACCGCTTAGGACAAGGCGAAAAAGAGTAAAATTACTGTATGGGTAAAACCTCTTA
AAGAAGGTTGCTGCTTTACAGCTGCAACAGTATGCGCTTGTCCAGAGATCCGTTCCGTTACAAAATGTGGA
CAACCTGCTATCTGTGTTAAACAAGAAGGCCAGAGAATGCTTGTGTTGCGTTGCCAGTAGTTTACAAAAT
TAATATAGTGAACCAAGGAACAGCAACAGCTCGTAACGTTGTTGTTGAAAATCCTGTTCCAGATGGTTACG

CTCATTCTTCTGGACAGCGTGTACTGACGTTTACTCTTGGAGATATGCAACCTGGAGAGCACAGAACAATT
ACTGTAGAGTTTTGTCCGCTTAAACGTGGTCTGCTACCAATATAGCAACGTTTCTTACTGTGGAGGACA
TAAAAATACAGCAAGCGTAACAACCTGTGATCAACGAGCCTTGCCTACAAGTAAGTATTGCAGGAGCAGATT
GGTCTTATGTTTGAAGCCTGTAGAATATGTGATCTCCGTTTCCAATCCTGGAGATCTTGTGTTGCGAGAT
GTCGTCGTTGAAGACACTCTTCTCCCGGAGTCACAGTCTTGAAGCTGCAGGAGCTCAAATTTCTTGTA
TAAAGTAGTTTGGACTGTGAAAGAACTGAATCCTGGAGAGTCTCTACAGTATAAAGTTCTAGTAAGAGCAC
AAACTCCTGGACAATTACAAAATAATGTTGTTGTGAAGAGCTGCTCTGACTGTGGTACTTGTACTTCTTGC
GCAGAAGCGACAACCTTACTGGAAGGAGTTGCTGCTACTCATATGTGCGTAGTAGATACTTGTGACCCTGT
TTGTGTAGGAGAAAACTGTTTACCGTATTGTTGTGTACCAACAGAGGTTCTGCAGAAGATACAAATGTTT
CTTTAATGCTTAAATCTCTAAAGAACTGCAACCTGTATCCTTCTCTGGACCAACTAAAGGAACGATTACA
GGCAATACAGTAGTATTGATTTCGTTACCTAGATTAGGTTCTAAAGAACTGTAGAGTTTTCTGTAACATT
GGAAGCAGTATCAGCTGGAGATGCTCGTGGGAAGCGATTCTTCTCCGATACATTGACTGTTCCAGTTT
CTGATACAGAGAATACACACATCTATTAA

SEQ ID NÚM.:12: secuencia de proteína CT443

MRIGDPMNKLIRRAVTFIFAVTSVASLFFASGVLETSMAESLSTNVLISLADTKAKDNTSHKSKKARKNHSKET
PVDRKEVAPVHESKATGPKQDSCFGRMYTVKVNDRNVEITQAVPEYATVVGSPYPIEITATGKRDCVDVII
TQQLPCEAEFVRSDPATPTADGKLVWKIDRLGQGEKSKITVWVKPLKEGCCFTAAATVCACPEIRSVTKCG
QPAICVKQEGPENACLRCPPVYKINIVNQGTATARNVVVENPVPDGYAHSSGQRVLTFTLGDMMQPEHRTI
TVEFCPLKRGRAATNIATVSYCGGHKNTASVTVINPCVQVSIAGADWSYVCKPVEYVISVSNPGLDLVLRD
VVVEDTLSPGVTVLEAAGAQISCNKVWTVKELNPGESLQYKVLVRAQTPGQFTNNVVVKSCSDCGTCTSC
AEATTYWKGAATHMCVVDTCDFPCVVGENTVYRICVTNRGSAEDTNVSLMLKFSKELQPVFSFGPTKGTIT
GNTVVFDSLRLGSKETVEFVTLKAVSAGDARGEAILSSDTLTPVSDTENTHIY

SEQ ID NÚM.:13: secuencia de nucleótidos CT372

ATGCAGGCTGCACACCATCACTATCACCGCTACACAGATAAACTGCACAGACAAAACCATAAAAAAGATCT
CATCTCTCCCAAACCTACCGAACAAGAGGCGTGCAATACTTCTTCCCTTAGTAAGGAATTAATCCCTCTAT
CAGAACAAAAGAGGCTTTTATCCCCATCTGTGACTTTATTTCGGAACGCCCTTGCTTACACGGAGTTTCT
GTTAGAAATCTCAAGCAAGCGCTAAAAAATCTGCAGGAACCCAAATTGCACTGGATTGGTCTATTCTCCC
TCAATGGTTCAATCCTCGGGTCTCTCATGCCCTAAGCTTTCTATCCGAGACTTTGGGTATAGCGCACACC
AAACTGTTACCGAAGCCACTCCTCCTTGCTGGCAAACTGCTTTAATCCATCTGCGGCCGTTACTATCTAT
GATTCTCATATGGGAAAGGGGCTTTTCAAATATCTTATACCCTTGTCGCTATTGGAGAGAGAATGCTGC
GACTGCTGCGATGTATGATGCTCGCAGGGAGTATCAATGATTATCCCTCTCGTCAGAACATTTTCTCTC
AGTTTACTTTCTCCCAAACTTCCCAAATGAACGGGTGAGTCTGACAATTGGTCAGTACTCACTCTATGCA
ATAGACGGAACATTATACAATAACGATCAACAACCTTGGATTCAATTAGTTACGCATTATCACAAAATCCAAC
AGCAACTTATTCTCTGGAAGTCTTGGAGCTTACCTACAAGTCGCTCTACCGCAAGCACAAAGTCTTCAAA
TAGGATTTCAGACGCTTATAATATCTCCGGATCTCTATCAAATGGAGTAACCTTACAAAAATAGATAC
AATTTTACGGTTTTGCTTCCGCTCCCGCTGTTGCTTAGGATCTGGCCAGTACTCCGTGCTTCTTTA
TGTGACTAGACAAGTTCAGAACAGATGGAACAAACAATGGGATGGTCAGTCAATGCGAGTCAACACATAT
CTTCTAAACTGTATGTGTTTGGAGATACAGCGGTGTTACAGGACATGTGTTCCCGATTAAACCGCACGTAT
TCATTCCGTATGGCTCTGCAAAATTTATTTAACCGTAACCCACAAGATTTATTTGGAATTGCTTGCGCATT
CAATAATGTACACCTCTCTGCTTCTCCAAATACTAAAAGAAAATACGAAACTGTAATCGAAGGGTTTGCAA
CTATCGGTTGCGGCCCTATCTTCTTTGCTCCAGACTTCCAACCTACCTCTACCCAGCTCTTCGTCCA
AACAAACAATCTGCCCGTGTATATAGCGTGCAGCTAATTTAGCTATCTAA

SEQ ID NÚM.:14: secuencia de proteína CT372

MQAAHHHHYHRYTDKLRQNHKKDLISPKPTEQEACNTSSLSKELIPLSEQRGLLSPICDFISERPC LHGVS
VRNLKQALKNSAGTQIALDWSILPQWFNPRVSHAPKLSIRDFGYSAHQTVTEATPPCWQNCFNPSAAVTIY
DSSYGKGVFQISYTLVRYWRENAATAGDAMMLAGSINDYPSRQNIQSFTFSQNFNERNVSLTIGQYSLYA
IDGTLYNNDDQQLGFISYALSQNPTATYSSGSLGAYLQVAPTASTSLQIGFQDAYNISGSSIKWSNLTKNRY
NFHGFASWAPRCCLGSGQYSVLLYVTRQVPEQMEQTMGWSVNASQHISSKLYVFGRYSGVTGHVFPINRTY
SFGMASANLFNRNPQDLFGIACAFNNVHLSASPNTKRKYETVIEGFATIGCGPYLSFAPDFQLYLYPALRP
NKQSARVYSVRANLAI

SEQ ID NÚM.:15: 3 - Secuencia de nucleótidos CT043

ATGTCCAGGCAGAATGCTGAGGAAAATCTAAAAAATTTTGCTAAAGAGCTTAAACTCCCCGACGTGGCCTT
CGATCAGAAATAATACGTGCATTTTGTGTTGATGAGAGATTTTCTCTTCACCTGACCTACGAAGAACACT
CTGATCGCCTTTATGTTTACGCACCTCTTCTTGACGACTGCCAGACAATCCGCAAAGAAGGTTAGCTCTA
TATGAGAAGTTGTTAGAAGGCTCTATGCTCGGAGGCCAAATGGCTGGTGGAGGGGTAGGAGTCGCTACTAA
GGAACAGTTGATCTTAATGCACTGCGTGTAGACATGAAGTATGCAGAGACCAACCTACTCAAAGCTTTTG
CACAGCTTTTATTGAAACCGTTGTGAAATGGCGAACTGTTTGTCTGATATCAGCGCTGGACGAGAACC
ACTGTTGATACCATGCCACAAATGCCTCAAGGGGGTGGCGAGGAATCAACCTCCTCCAGCAGGAATCCG
TGCATAA

SEQ ID NÚM.:16: - Secuencia de proteína CT043

MSRQNAEENLKNFAKELKLPDVAFDQNNTCILEVDGEFSLHLTYEEHSDRLVYVAPLLDGLPDNPQRRLLAL
YEKLLGSGMLGGQMAGGGVGVAKEQLILMHCVLDMKYAETNLLKAFQQLFIETVVKWRTVCSDISAGREP
TVDTMPQMPQGGGGGIQPPAGIRA

SEQ ID NÚM.:17: secuencia de proteína CT681

MKKLLKSVLVFAALSSASSLQALPVGNPAPESLMIDGILWEGFGGDPDCPCATWCDAISMRVGYGDFVFD
RVLKTDVNKEFQMGAKPTTDTGNSAAPSTLTARENPAYGRHMQDAEMFTNAACMALNIWDRFDVFTLGAT
SGYLKGNASAFNLVGLFGDNENQKTVKAESVPNMSFDQSVVELYDTTFAWSVGARAALWECGCATLGASF
QYAQSKPKVEELNVLNCNAEFTINKPKGYVGKEFPLDLTAGTDAATGDKDASIDYHEWQASLALSYRLNMF
TPYIGVKSRSASFADTIRIAQPKSATAIFDTTTTLNPTIAGAGDVKTGAEGQLGDTMQIVSLQLNKMKS
SCGIAVGTTIIVDADKYAVTVETRLIDERAHVNAQFRF

SEQ ID NÚM.:18: secuencia de nucleótidos CT823

ATGAAAAAACTCTTGAAATCGGTATTAGTATTTGCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTCCTTGCAAGCTCTGCC
TGTGGGGAATCCTGCTGAACCAAGCCTTATGATCGACGGAATCTGTGGGAAGGTTTCGCGCGAGATCCTT
GCGATCCTTGCGCCACTTGGTGTGACGCTATCAGCATGCGTGTGTTACTACGGAGACTTTGTTTTCGAC
CGTGTTTTGAAACAGATGTGAATAAAGAATTTTCAGATGGGTGCCAAGCCTACAACTGATACAGGCAATAG
TGCAGCTCCATCCACTCTTACAGCAAGAGAGAATCCTGCTTACGGCCGACATATGCAGGATGCTGAGATGT
TTACAAATGCCGCTTGCATGGCATTGAATATTTGGGATCGTTTTGATGTATTCTGTACATTAGGAGCCACC
AGTGGATATCTTAAAGGAAACTCTGCTTCTTCAATTTAGTTGGATGTTTTGGAGATAATGAAAATCAAAA
AACGGTCAAAGCGGAGTCTGTACCAATATGAGCTTTGATCAATCTGTTGTTGAGTTGTATACAGATACTA
CTTTTGCCTGGAGCTCGCGCGTCCGCGAGCTTTGTGGGAATGTGGATGTGCAACTTTAGGAGCTTCAATC
CAATATGCTCAATCTAAACCTAAAGTAGAAGAATTAACGTTCTCTGCAATGCAGCAGAGTTTACTATTAA
TAAACCTAAAGGATATGTAGGTAAGGAGTTTCCTCTTGATCTTACAGCAGGAACAGATGCTGCGACAGGAA
CTAAGGATGCCTCTATTGATTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTACAGACTGAATATGTTT
ACTCCCTACATTGGAGTTAAATGGTCTCGAGCAAGCTTTGATGCCGATACGATTTCGTATAGCCAGCCAAA
ATCAGCTACAGCTATTTTTGATACTACCACGCTTAACCAACTATTGCTGGAGCTGGCGATGTGAAAACG
GCGCAGAGGGTCAGCTCGGAGACACAATGCAATCGTTTCCCTGCAATTGAACAAGATGAAATCTAGAAAA
TCTTGCGGTATTGCAGTAGGAACAACCTATTGTGGATGCAGACAAATACGCAGTTACAGTTGAGACTCGCTT
GATCGATGAGAGAGCAGC

SEQ ID NÚM.:19: secuencia de proteína TC0210

MMKRLLCVLLSTSVFSSPMLGYAPKKSSTGICLAASQSDRELSQEDLLKEVSRGFSKVAAQATPGVVYI
ENFPKTSQAIASPGNKRGFQENPFDFYFNDEFFNRFFGLPSHREQPRPQQRDAVRGTGFIIVSEDGYVVTNH
HVVEDAGKIHVTLHDGQKYTAKIIGLDPKTDLAVIKIQAKNLPFLTFGNSDQLQIGDWSIAIGNPFGLOAT
VTVGVISAKGRNLHIVDFEDFIQTDAAINPGNSGGPLNIDGQVIGVNTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMA
KRVIDQLISDGQVTRGFLGVTLQPIDSELAACYKLEKVYGALITDVVKGSPAEEKAGLRQEDVIVAYNGKEV
ESLSALRNAISLMMPGTRVVLKVVREGKFIETVTVTQIPAEDGVSALQKMGVRVQNLTPEICKKLGLASD
TRGIFVVSVEAGSPAASAGVVPQQLILAVNRQRVSSVEELNQVLKNAKGENVLLMVSQGEVIRFVVLKSD

SEQ ID NÚM.:20: secuencia de proteína TC0052

MKKLLKSVLAFVLGSASSLHALPVGNPAPESLMIDGILWEGFGGDPCTTWCDALSLRLGYYGDFVFD
RVLKTDVKNQFEMGAAPTGDADLTAPTASRENPAYGKHMQDAEMFTNAAYMALNIWDRDFVCTLGATS
GYLKGNSAAFNVLVGLFGRDETAVAADDIPNVSLSQAVVELYTDTAFAWSVGARAALWECGCATLGASFQYA
QSKPKVEELNVLNCAAEFTINKPKGYVGQEFPLNIKAGTVSATDTKDASIDYHEWQASLALSRLNMFPTPY
IGVKWSRASFDADTIRIAQPKLETSILKMTTWNPTISGSGIDVDTKITDITLQIVSLQLNKMKSRSKSCGLAI
GTTIVDADKYAVTVETRLIDERAHVNAQFRF

SEQ ID NÚM.:21: secuencia de nucleótidos TC0052

5

ATGAAAAAACTCTTGAAATCGGTATTAGCATTGCGCGTTTGGGTTCTGCTTCCTCCTTGCGATGCTCTGCC
TGTTGGGAATCCTGCTGAACCAAGCCTTATGATTGACGGGATTCTTTGGGAAGGTTTCGGTGGAGATCCTT
GCGATCCTTGACAACTTGGTGTGATGCCATCAGCCTACGTCTCGGCTACTATGGGGACTTCGTTTTTGAT
CGTGTITTTGAAAACAGACGTGAACAAACAGTTCGAAATGGGAGCAGCTCCTACAGGAGATGCAGACCTTAC
TACAGCACCTACTCCTGCATCAAGAGAGAATCCCGCTTATGGCAAGCATATGCAAGATGCAGAAATGTTCA
CTAATGCTGCGTACATGGCTTTAAACATTTGGGACCGTTTCGATGTATTTTGTACATTGGGAGCAACTAGC
GGATATCTTAAAGGTAATTTGCGCGCTTTAACTTAGTTGGTCTGTTTGAAGAGATGAACTGCAGTTGC
AGCTGACGACATACCTAACGTCAGCTTGTCTCAAGCTGTGTCGAACTCTACACAGACACAGCTTTCGCTT
GGAGCGTCGGTGCTAGAGCAGCTTTATGGGAGTGCGGATGTGCAACTTTAGGAGCTTCCTTCCAATATGCT
CAATCTAAGCCAAAAGTAGAGGAATTAACGTTCTCTGTAATGCGGCAGAATTCATATTAACAAGCCTAA
AGGATACGTTGGACAAGAGTTTCTCTTAAACATTAAAGCTGGAACAGTTAGCGCTACAGATACTAAAGATG
CTTCCATCGATTACCATGAGTGGCAAGCAAGCTTGGCTTTGTCTTACAGACTGAATATGTTCACTCCTTAC
ATTGGAGTTAAGTGGTCTAGAGCAAGCTTTGATGCCGACACTATCCGATTGCGCAGCCTAAGCTTGAGAC
CTCTATCTTAAAAATGACCCTTGGAAACCAACGATCTCTGGATCTGGTATAGACGTTGATACAAAAATCA
CGGATACATTACAAATTGTTTCTTGCAGCTCAACAAGATGAAATCCAGAAAATCTTGCGGTCTTGCAATT
GGAACAACAATTGTAGATGCTGATAAATATGCAGTTACTGTTGAGACACGCTTGATCGATGAAAGAGCAGC
TCACGTAAATGCTCAGTTCCGTTCTAA

SEQ ID NÚM.:22: secuencia de proteína TC0106

MLTNFTFRNCLLFFVTLSVVPVFSAPQPRVTLPSGANKIGSEAWIEQKVRQYPELLWLVEPSPAGTSLNAP
SGMIFSPLLFQKKVPAFDIAVRSLIHLHLIIQGSQYAYQLVQLQANESPMTFKQFLTLHKQLSLFLNSPK
EFYDSVKILETAIIILRLHLCSTKAVATFKPYFSETQKEVFYTKALHVLHTFPELSPSFARLSPEQKTLFFS
LRKLANYDELLSLTNAPSLQLLSAVRSRRALLALDLYLYALDFCGEQGISSQFHMDFSPLQSMLOQYATVE
EAFSRYFTYRANRLGFAGSSRTEMALVRIATLMNLSPSEAAIILTSFKSLSLDEAESLVNSFYTNKGDSL
LSLRGLPTLISELTRAHGNNTNAEARAQQIYATTLSLVAKSLKAHKEMQNKQILPEEVVLDLDFSETASSCQG
LDIFSENVAVQIHLNGSVSIHL

10

SEQ ID NÚM.:23: homólogo de CM de CT601 = TC_0551

ATGGCATCCAAGTCTCGTCATTATCTTAACCAGCCTTGGTACATTATCTTATTCATCTTTGTTCTTAGTCT
GGTTGCTGGTACCCCTTCTTTCTTCAGTTTCCTATGTTCTATCTCCAATCCAAAAACAAGCTGCAGAATTTG
ATCGTAATCAGCAAAATGTTGATGGCGCACAAATTATTTCTATGACATAAAATTCAAATATATGCTGAA
GGGGATTGGCAACCTGCTGCTATAATACAAAAAACAGATACTAGAAAAAGCTCTTCCACTCCACCACA
AGTGACTGTGGCGACTCTATGCTCTTATTTTCAAATTTTGTAGAGTTTGTCTTACAGACTCCCAAGGGA
ATCTTTCTTCTTTGAAGATCACAATCTTAACCTAGAAGAGTTCTTATCCCACCCACATCTTCAGTACAA
GATCACTCTCTGCATGTAATTTATGCTATTCTAGCAAACGATGAATCCTCTAAAAAGTTATCATCCTCCCA
AGTAGCAAAAAATCCGGTATCCATAGAGTCTATTATTTCTCTATAAAAGGATTTGGTTTATGGGGACCAA
TCTATGGATTTCTTGCTTTAGAAAAGGACGGTAATACGGTTCTAGGGACATGCTGGTATCAACATGGTGA
ACTCCAGGATTAGGAGCAAAATATACTAATCCCAATGGCAACAAAATTTAGAGGAAAAAAGTATTTCT
CGCTTCTCTTCCGGAGAAACCGATTTTGCTAAACAACCTAGGACTAGAAAGTTATAAAAGGATCTGTTT
CTGCATTATTAGGGGACTCTCCCAAAGCTAATTCGCTGTTGATGGAATTTAGGAGCTACACTGACCTGT
AATGGAGTTACTGAAGCTTTTGCTAATTCGCTAGCTCCTTACCGCCCTTATTGACTTTCTTCGCCAATCT
TAACTCTAGTGGAGAATCTCATGACAACCAATAA

SEQ ID NÚM.:24: homólogo de CM de secuencia de la proteína CT601 = secuencia de proteína TC_0551

MASKSRHYLNQWPYIIILFIVLSLVAGTLLSSVSIVLSPIQKQAAEFDRNQMLMAAQIISYDNKFQIYAE
GDWQPAVYNTKKQILEKSSSTPPQVTATLCSYFQNFVRVLLTDSQGNLSSFEDHNLNLEEFLSHPTSSVQ
DHSLHVIIYAILANDESSKLSSSQVAKNPVSIESIILPIKGFGLWGPYIGFLALEKDGNTVLGTWCYQHGE
TPGLGANITNPQWQQNFRGKKVFLASSSGETDFAKTTLGLEVIKGSVSALLGDSPKANSAVDGISGATLTC
NGVTEAFANSLAPYRPLLTFFANLNSSGESHDNQ

15

SEQ ID NÚM.:25: homólogo de CM de CT372 = secuencia de nucleótidos TC_0651

ATGAATGGAAAAGTTCTGTGTGAGGTTTCTGTGTCCTTCCGTTTCGATTCTGCTGACGGCTCTGCTTTCACT
TTCTTTTACAAACACTATGCAGGCTGCACACCATCATTATCACCGTTATGATGATAAACTACGCAGACAAT
ACCATAAAAAGGACTTGCCCACTCAAGAGAATGTTGCGAAAGAGTTTTGTAATCCCTACTCTCATAGTAGT
GATCCTATCCCTTTTGTACAAACAGGAGTCTATCTCCTATCTGTGATTAGTCTCAGAGTGCTCGTT
TTTGAACGGGATTTCCGTTAGGAGTCTTAAACAAACACTGAAAAATTCTGCTGGGACTCAAGTTGCTTTAG
ACTGGTCTATCCTTCTCAATGGTTCAATCCTAGATCCTCTTGGGCTCCTAAGCTCTCTATTTCGAGATCTT
GGATATGGTAAACCCAGTCCCTTATTGAAGCAGATTCCCTTGTGTCAAACCTGCTTCAACCCATCTGC
TGCTATTACGATTTACGATTCTTCATGTGGGAAGGGTGTGTGTCGAAGTGTACACACCCCTTGTTCGTTATT
GGAGAGAAACGGCTGCACCTTGCAGGGCAACTATGATGCTTGCAGGAAGTATTAATGATTATCCTGCTCGC
CAAAACATATTCTCTCAACTTACATTTTCCCAAACCTTCCCTAATGAGAGAGTAAATCTAAGTGTGGTCA
ATACTCTCTTACTCGATAGACGGAACGCTGTACAACAATGATCAGCAGCTAGGATTATTAGTTATGCGT
TGTCGCAAAATCCAACAGCGACTTATCTCTGGAAGCCTTGGCGCCTATCTACAAGTCGCTCCAACAGAA
AGCACCTGTCTTCAAGTTGGGTTCGAAGATGCCTATAATATTTAGGTTCTCTGATCAAATGGAATAATCT
TACAAAAATAAGTATAACTTCCATGGCTATGCATCTTGGGCTCCCACTGTTGCTTAGGACCTGGACAAT
ACTCTGTTCTCTTTATGTAACAGAAAGGTTCTTGAGCAATGATGCAGACAATGGGCTGGTCTGTGAAT
GCAAGTCAATACATCTCTTCTAACTTTATGATATTGGAAGATACAGCGGAGTACAGGCCAATTGCTTCC
TATTAACCGAACCTATTCAATTTGGCTTAGTCTCTCTAATTTATTGAACCGTAACCCACAAGACTTATTG
GAGTAGCTTGGCGATTCAATAATATACAGCCTCCGCTTTCAAATGCTCAAAGAAAAATGAAACTGTG
ATCGAGGGATTGCAACTATTGGTTGCGGACCTTACATCTCTTTGCTCCAGATTTCACCTTTACCTCTA
TCCTGCTCTGCGTCCAAATAAACAAAGCGCCGAGTCTATAGCGTTGCGCGAAACCTAGCTATTTAG

SEQ ID NÚM.:26: homólogo de CM de CT372 = secuencia de proteína TC_0651

MNGKVLCEVSVSFRSILLTALLSLSFTNTMQAAHHHHYHRYDDKLRRQYHKKDLPQTQENVRKEFCNPYSHSS
DPIPLSQQRGVLSPICDLVSECSFLNGISVRSCLKQTLKNSAGTQVALDWSILPQWFNPRSSWAPKLSIRDL
GYGKQPQSLIEADSPCCQTCFNPAAITTIYDSSCGKGVVQVSYYTLVRYWRETAALAGQTMMLAGSINDYPAR
QNIFSLTFQSFTFNPVERNLTGQYSLYSIDGTYLNNDQQLGFIYALSQNPTATYSSGSLGAYLQVAPTE
STCLQVGFQDAYNISGSSIKWNLLTKNKNFHYASWAPHCCLGPGQYSVLLYVTRKVPQMMQTMGWSVN
ASQYISSKLYVFGRYSGVLTGQLSPINRTYSFGLVSPNLLNRNPQDLFGVACAFNNIHASAFQNAQRKYETV
IEGFATIGCGPYISFAPDFQLYLYPALRPNKQSARVYSVRANLAI

5

SEQ ID NÚM.:27: homólogo de CM de CT443 = TC_0727

ATGCGAATAGGAGATCCTATGAACAACTCATCAGACGAGCTGTGACGATCTTCGCGGTGACTAGTGTGGC
GAGTTTATTGCTAGCGGGGTGTTAGAGACCTCTATGGCAGAGTCTCTCTACCAACGTTATTAGCTTAG
CTGACACCAAAGCGAAAGAGACCACTTCTCATCAAAAAGACAGAAAAGCAAGAAAAAATCATCAAAATAGG
ACTTCCGTAGTCCGTAAGAGGTTACTGCAGTTCTGTGATACTAAAGCTGTAGAGCCTAGACAGGATTCTTG
CTTTGGCAAAATGTATACAGTCAAAGTTAATGATGATCGTAATGTAGAAATCGTGCAGTCCGTTCTCTGAAT
ATGCTACGGTAGGATCTCCATATCCTATTGAGATTACTGCTATAGGAAAAAGAGACTGTGTTGATGTAATC
ATTACACAGCAATTACCATGCGAAGCAGAGTTTGTAGCAGTGATCCAGCTACTACTCTACTGCTGATGG
TAAGCTAGTTTGGAAAAATTGATCGGTTAGGACAGGGCGAAAAGAGTAAAATTACTGTATGGGTAACACCTC
TTAAAGAAGGTTGCTGCTTTACAGCTGCAACGGTTTGTGCTTGTCCAGAGATCCGTTTCGGTTACGAAATGT
GGCCAGCCTGCTATCTGTGTTAAACAGGAAGGTCAGAAAAGCGCATGTTTGCCTGCCCAGTAACCTTATAG
AATTAATGTAGTCAACCAAGGAACAGCAACAGCACGTAATGTTGTTGTGGAATAATCCTGTTCCAGATGGCT
ATGCTCATGCATCCGACAGCGTGTATTGACATATACTCTTGGGGATATGCAACCTGGAGAACAGAGAACA
ATCACCGTGGAGTTTGTCCGCTTAAACGTGGTCGAGTCACAAATATTGCTACAGTTTCTTACTGTGGTGG

ACACAAAAATACTGTAGCGTAACAACAGTGATCAATGAGCCTTGCCTGCAAGTTAATCGAGGGAGCAG
ATTGGTCTTATGTTTGAAGCCTGTAGAATATGTTATCTCTGTTTCTAACCTGGTGACTTAGTTTTACGA
GACGTTGTAATGAAGATACGCTTTCTCTGGAATACTGTTGTTGAAGCAGCTGGAGCTCAGATTCTTG
TAATAAATTGTTTGGACTTTGAAGGAACTAATCTCGAGAGTCTTACAATATAAGGTTCTAGTAAGAG
CTCAAACTCCAGGGCAATTACAAAACAACGTTGTTGTGAAAAGTTGCTCTGATTGCGGTATTGTACTTCT
TGCGCAGAAGCAACAACCTTACTGAAAGGAGTTGCTGCTACTCATATGTGCGTAGTAGATACTGTGATCC
TATTTGCGTAGGAGAGAACACTGTTTATCGTATCTGTGTGACAAACAGAGTTTCTGCTGAAGATACAAATG
TGCTCTTAATTTTGAATTTCTTAAAGAATTACAACCTATATCTTTCTCTGGACCAACTAAAGGAACCAT
ACAGGAAACACGGTAGTGTGTTGATTACCTAGATTAGGTTCTAAAGAACTGTAGAGTTTTCTGTAAAC
GTTGAAAGCAGTATCCGCTGGAGATGCTCGTGGGAAGCTATTCTTTCTTCCGATACATTGACAGTTCTCTG
TATCTGATACGGAGAATACACATATCTATTAA

SEQ ID NÚM.:28: homólogo de CM de CT443 = TC_0727

MRIGDPMNKLIRRAVTFIAVTSVASLFSAGVLETSMAESLSTNVISLADTKAKETTSHQKDRKARKNHQNR
TSVVRKEVTAVRDTKAVEPRQDSFCFGKMYTVKVNDDRNVIVQSVPEYATVGSPYPIEITAIGKRDCVDVI
ITQQLPCEAEFVSSDPATPTADGKLVWKIDRLGQGEKSKITVWVKPLKEGCCFTAATVCACPEIRSVTKC
GQPAICVKQEGPESACLRCPVTYRINVVNQGTATARNVVVENPVPDGYAHASGQRVLTYTLGDMQPGEQRT
ITVEFCLPKRGRVTNIATVSYCGGHKNTASVTTVINPEVCQVNIAGADWSYVCKPVEYIVSVNPGDLVLR
DVVIEDTLSPGITVVEAAGAQISCNKLVWTLKELNPESLQYKVLVRAQTGPGQFTNNVVVKSCTDCGICTS
CAEATTYWKGAATHMCVVDTCDFICVGVNTVYRICVTNRGSAEDTNVSLILKFSKELQPISESGPTKGTI
TGNTVVFDSLPRLGSKETVEFSVTLKAVSAGDARGEAILSSDTLTVPVSDTENTHIY

10

SEQ ID NÚM.:29: homólogo de CM de CT043 = secuencia de nucleótidos TC_0313

ATGTCCAGACAGAATGCTGAGGAAAATCTAAAAATTTTGCTAAAGAGCTCAAGCTCCCCGACGTGGCCTT
CGATCAGAATAATACGTGCATTTTGTGTTGATGGAGAGTTTTCTCTTACCTGACCTACGAAGAGCACT
CTGATCGCCTTTATGTTTACGCACCTCTCCTTGACGGACTCCAGATAATCCGCAAAGAAAGTTGGCTCTG
TATGAGAAATTGTTGGAAGGCTCTATGCTCGGAGGCCAAATGGCTGGTGGAGGAGTAGGAGTTGCTACTAA
AGAACAGTTGATCCTAATGCATTGCGTGTTAGATATGAAATATGCAGAGACTAATCTATTGAAAGCTTTTG
CACAGCTTTTCATTGAAACTGTTGTGAAATGGCGAACGGTCTGTTCTGATATCAGCGCTGGACGAGAACCT
TCCGTTGACACTATGCCTCAAATGCCTCAAGGAGGCAGCGGAGGAATTCAACCTCCTCCAACAGGAATTG
TGCCTAG

SEQ ID NÚM.:30: homólogo de CM de CT043 = secuencia de proteína TC_0313

MSRQNAEENLNKFAKELKLPDVAFDQNNCTILFVDGEFSLHLTYEEHSDRLYVYAPLLDGLPDNPQRKLAL
YEKLLGSMGLGGMAGGGVGATKEQLILMHCVLDMKYAETNLLKAFAQLFIETVVKWRTVCSDISAGREP
SVDTMPQMPQGGSGGIQPPPTGIRA

5

SEQ ID NÚM.:31: secuencia de proteína TC0431

MPHSPFLYVVQPHSVFNRLGERHPITLDFIKEKNRLADFIENLPLEIFGAPSFLENASLEASYVLSREST
KDGTLFTVLEPKLSACVATCLVDSSIPMEPDNELLEIKHTLLKSSCDGVQYRVTRITLQNKDEAPRVSLV
ADDIELIRNVDFLGRSVDIVKLDPLNIPNTVSEENALDYSFTRETAKLSPDGRVGIPQGTIKILPAPSLEVE
ISTSI FEETSSFEQNFSSSITFCVPPLTSFSPLQEPPLVGAGQQEILVTKKHLFPSYTPKLIDIVKRHKRD
AKILVNKIQFEKLWRSHAKSQILKEGSRVLDLQGFTELFNYQLQVGSHTIAAVLIDPEIANVKSLEPEQTY
AVRKIKSGFQCSLDDQHIYQVAVKKHLSLSQPPKISPLSQSESSDLSLFEAAAFSASLTIEFVKKNKYHA
KNTVTCSTVSHSLYILKEDDGANAAEKRLDNSFRNWNVENKLNANSPDCTAFIQKFGTHYITSAFSGSGF
QVLKLSFEQVEGLRSKKISLEAAAANSLLKSSVSNSTESGYSTYDSSSSSHTVFLGGTVLPVSHDGLDFK
DWSESVCLEPVP IHIISLLPLTDLTPLYFPETDTTELSNKRNALQQAVRVYLDKHSRQKQSERSVFTAGIN
SPSSWFTLESANSPLVVSSPYMTYWSTLPYLFPTLKERSSAAPIVFYFCVDNNEHASQKILNQTYCFIGSL
PIRQKIFGREFAENPYLSFYGRFGEAYFDGGYPERCGWIVEKLNNTKDQILRDEDEVQLKHVYSGEYLSSTI
PIKDSHCTLRSRCTESNAVFIIKKPSSY

SEQ ID NÚM.:32 homólogo de CM de CT279 = secuencia de nucleótidos TC_0890

ATGCTCGCTAATCGGTTATTTCTAATCACCTTTATAGGTTTTGGCTATTCTGCTTACGGTGCCAGCACAGG
GAAATCACCTTCTTTACAGGTTATTTTACGCTGAAGTCGAGGATACATCTTCGCGCTTACAAGCTCATCAGA
ATGAGCTTGTTATGCTCTCGGAACGTTTAGATGAGCAAGACACAAAACCTTCAACAACCTCTCGTCAACTCAG
GCCCGTAATCTTCTCAACAAGTTCAACGGCTTGAGATTGATCTGAGAGCTCTGGCTAAAACAGCTGCTGT
GCTCTCGCAATCTGTTTACGATATCCGATCATCCGTGCAAAATAAATTACAAGAAATCCAACAAGAACAAA
AAAATTTAGCTCAAAATTTACGAGCGCTTCGCAACTCCTTACAAGCACTAGTTGATGGCTCTTCCCCAGAA
AATTATATTGATTTTTTGGCCGGGGAGACACCTGAACATATTACGTTGTTAAACAAGGAGAAACCCTGAG
TAAAATCGCTAGTAAGTACAATATCCCTGTCGCAGAATTGAAAAAAGCTTAATAAATTAAATCCGATACTA
TTTTTACTGATCAAAGAATCCGACTTCCAAAAAAGAAATAA

SEQ ID NÚM.:33: SEQ ID NÚM.:26: homólogo de CM de CT279 = secuencia de proteína TC_0890

MLANRLFLITLIGFGYSAYGASTGKSPSLQVILAEVEDTSSRLQAHQNELVMLSERLDEQDTKLQQLSSTQ
ARNLPQQVQRLEIDLRLAKTAAVLSQSVQDIRSSVQNKLQEIQQEQKNLAQNLRALRNSLQALVDGSSPE
NYIDFLAGETPEHIVVKQGETLSKIASKYNIPVAELKKLNKLNSDTIFTDQRIRLPKKK

10

SEQ ID NÚM.:34: secuencia de la proteína TC0660

MSMYIKRKKAWMTFLAIVCSFCLAGCSKESKDSVSEKFIVGTNATYPPFEFVDERGETVGFIDIDLAREISK
KLGKKLEVREFAFDALVLNLKQHRIDAIMAGVSITSSRLKEILMIPYYGEEIKSLVLVFKDGDGSKSLPLDQ
YNSVAVQTGTYQEEYLQSLPGVRIRSFSTLEVLMEVLHSHKSPIAVLEPSIAQVVLKDFPTLTETIDLPE
DKWVLGYGIGVASDRPSLASDIEAAVQEIKKEGVLAELEQKWGLNG

SEQ ID NÚM.:35: secuencia de proteína TC0741

MTTPISNSPSSIPTVTVSTTTASSGSLGTSTVSSTTTSTSVAQATTSSASTSIIQSSGENIQSTTGTPS
 PITSSVSTSAVSPKASATANKTSSAVSGKITTSQETSEESETQATTSDGEVSSNYDDVDTPTNSSDSTVDS
 YQDVETQYKTISNNGENTYETIGSHGEKNTHVQESHASGTGNPINNQEAIRQLRSSTYTSPRNENIFSP
 GPEGLPNMSLPSYSPTDKSSLLAFLSNPNTKAKMLEHSGHLVFDITRSSFIFVPNGNWDQVCSMKVQNGK
 TKEDLGLKDLEDCAKFCCTGYNKFSSDWGNRVDPLVSSKAGIESGGHLPSSVIINNKFRTCVAYGPWNPKE
 NGPNYTPSAWRRGRHVRVDFGKIFDGTAPFNKINWGSSPTPGDDGISFSNETIGSEPFATPPSSPSQTPVINV
 NVNVGGTNVNIGDTNVSKGSGTPTSSQSVDMSDTSDDLTDSDIDTNNQTNGDINTDNSNNVDGSLSDVDS
 RVEDDDGVSDTESTNGNDSGKTTSTEENGDPSPGDILAAVRKHLDTVYPGENGGSTEGPLPANQNLGNVIH
 DVEQNGSAKETIIITPGDTGPTDSSSSVDADADVEDTSDTDSGIGDDDGVSDETESTNGNNSGKTTSTEENG
 PSGPDILAAVRKHLDTVYPGENGGSTEGPLPANQNLGNVIHDVEQNGAAQETIIITPGDTESTDTSSSVNAN
 ADLEDVSDADSGFGDDGISTESTNGNDSGKNTPVGDGGTPSPGDILAAVRKHLDTVYPGENGGSTERPL
 PANQNLGDIHDVEQNGSAKETVVSPIYRGGGGNTSSPIGLASLLPATPSTPLMTTPRTNGKAAASSLMIKG
 GETQAKLVKNGGNIPGETTLAELLRLRGHLDKVFTSDGKFTNLNGPQLGAIDQFRKETGSGGIIAHTDS
 VPGENGASPLTGSSGEKVSLEYDAAKNVTQALTSVTNKVTLAMQGQKLEGIINNNTPPSSIGQNLFAAARA
 TTQSLSSLIGTVQ

5 REFERENCIAS:

- [1] Morrison SG & Morrison RP, (2005) J Immunol., 175(11):7536-42.
- [2] Morrison RP and Caldwell, HD (2002) Infect. Immun., 70(6):2741-51, Review.
- [3] Brunham RC and Rey-Ladino (2005) Nat. Rev. Immunol., 5(2) :149-161, Review.
- [4] Brunham RC and Rey-Ladino J (2005), Nat Rev Immuno. 5: 149-161.
- 10 [5] Su H and Caldwell HD (1995), Infect Immun 63: 3302-33085.
- [6] Moore, T. et. al., J. Infect. Dis., 2003, 15, 188(4): 617-624
- [7] Morrison SG and Morrison RP, (2001) Infect. Immun. 69(4): 2643-2649.
- [8] Morrison SG & Morrison RP, (2005) J Immunol., 175(11):7536-42.
- [9] WO03/049762.
- 15 [10] WO2006/138004.
- [11] WO2007/110700.
- [12] WO 2006/046143.
- [13] Bernadec et al. (1998), J. Bacteriol 180(18):4872-4878.
- [14] Berlanda Scorza, F. et al. Mol. Cell Proteomics (2008), 7(3): 473-485.
- 20 [15] Murakami et al. Oral Microbiol. Immunol. 2007, 22: 356-360.
- [16] Thaler, D.S., Genome, 1989, 31(1): 53-67
- [17] Infect Immun. 72: 1914-1919, 2004.
- [18] WO 02/09643.
- [19] Katial et al. 2002, Infect Immun, 70: 702-707.
- 25 [20] Beveridge, 1999, J. Bacteriol. 181: 4725-4733.
- [21] Moe et al. 2002, Infect. Immun. 70:6021-6031.
- [22] Argita et al. 2003, Vaccine, 21, 950-960.
- [23] Lipinska, B. et al., J. Bacteriol., 172, 1791-1797.
- [24] Gray, C.W. et al., Eur. J. Biochem., 2000, 267, 5699-5710.
- 30 [25] Savopoulos, J.W. et al., Protein Expres. Purif., 2000, 19, 227-234.

- [26] Huston, W.M. et al., FEBS Letters, 2007, 3382-3386.
- [27] Winter et al., (1991) Nature 349:293-99.
- [28] US 4,816,567.
- [29] Inbar et al., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69:2659-62.
- 5 [30] Ehrlich et al., (1980) Biochem 19:4091-96.
- [31] Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5897-83.
- [32] Pack et al., (1992) Biochem 31, 1579-84.
- [33] Cumber et al., (1992) J. Immunology 149B, 120-26.
- [34] Riechmann et al., (1988) Nature 332, 323-27.
- 10 [35] Verhoeyan et al., (1988) Science 239, 1534-36.
- [36] GB 2,276,169.
- [37] Nature (1975) 256:495-96.
- [38] WO99/27961.
- [39] WO02/074244.
- 15 [40] WO02/064162.
- [41] WO03/028760.
- [42] US patent 6355271.
- [43] WO00/23105.
- [44] WO90/14837.
- 20 [45] WO90/14837.
- [46] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- [47] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
- [48] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 25 [49] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [50] WO2008/043774.
- [51] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- [52] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- 30 [53] US-2007/014805.
- [54] US-2007/0191314.
- [55] Suli et al. (2004) Vaccine 22(25-26):3464-9.
- [56] WO95/11700.
- [57] US patent 6080725.
- 35 [58] WO2005/097181.
- [59] WO2006/113373.
- [60] Han et al. (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.

- [61] US-6630161.
- [62] US 5,057,540.
- [63] WO96/33739.
- [64] EP-A-0109942.
- 5 [65] WO96/11711.
- [66] WO00/07621.
- [67] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [68] Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [69] Niikura et al. (2002) *Virology* 293:273-280.
- 10 [70] Lenz et al. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [71] Pinto et al. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [72] Gerber et al. (2001) *J Virol* 75:4752-4760.
- [73] WO03/024480.
- [74] WO03/024481.
- 15 [75] Gluck et al. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [76] EP-A-0689454.
- [77] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [78] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [79] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- 20 [80] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [81] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [82] WO02/26757.
- [83] WO99/62923.
- [84] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- 25 [85] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [86] WO98/40100.
- [87] US 6,207,646.
- [88] US 6,239,116.
- [89] US 6,429,199.
- 30 [90] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [91] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [92] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [93] WO01/95935.
- [94] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- 35 [95] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [96] WO03/035836.
- [97] WO01/22972.

- [98] Schellack et al. (2006) *Vaccine* 24:5461-72.
- [99] Kamath et al. (2008) *Eur J Immunol* 38:1247-56.
- [100] Riedl et al. (2008) *Vaccine* 26:3461-8.
- [101] WO95/17211.
- 5 [102] WO98/42375.
- [103] Beignon et al. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [104] Pizza et al. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [105] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [106] Scharon-Kersten et al. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- 10 [107] Ryan et al. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [108] Partidos et al. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [109] Peppoloni et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [110] Pine et al. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [111] Tebbey et al. (2000) *Vaccine* 18:2723-34.
- 15 [112] Domenighini et al. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [113] WO99/40936.
- [114] WO99/44636.
- [115] Singh et al] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [116] WO99/27960.
- 20 [117] US 6,090,406.
- [118] US 5,916,588.
- [119] EP-A-0626169.
- [120] WO99/52549.
- [121] WO01/21207.
- 25 [122] WO01/21152.
- [123] Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [124] Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [125] US 4,680,338.
- [126] US 4,988,815.
- 30 [127] WO92/15582.
- [128] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [129] Wu et al. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [130] Vasilakos et al. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
- 35 [131] Patentes de los Estados Unidos
4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5
525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 66
70372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
- [132] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.

- [133] WO03/011223.
- [134] Hu et al. (2009) *Vaccine* 27:4867-73.
- [135] WO2004/060308.
- [136] WO2004/064759.
- 5 [137] US 6,924,271.
- [138] US2005/0070556.
- [139] US 5,658,731.
- [140] US patent 5011828.
- [141] WO2004/87153.
- 10 [142] US 6,605,617.
- [143] WO02/18383.
- [144] WO2004/018455.
- [145] WO03/082272.
- [146] Wong et al. (2003) *JClin Pharmacol* 43(7):735-42.
- 15 [147] US2005/0215517.
- [148] Dyakonova et al. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.
- [149] FR-2859633.
- [150] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
- [151] WO2004/064715.
- 20 [152] De Libero et al, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496.
- [153] US patent 5936076.
- [154] Oki et al, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640.
- [155] US2005/0192248.
- [156] Yang et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822.
- 25 [157] WO2005/102049.
- [158] Goff et al, *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603.
- [159] WO03/105769.
- [160] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
- [161] WO99/11241.
- 30 [162] WO94/00153.
- [163] WO98/57659.
- [164] Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- [165] WO2006/110603.
- [166] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- 35 [167] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.).
- [168] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications).

- [169] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [170] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997).
- [171] Ausubel et al. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).
- 5 [172] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [173] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag).
- [174] Geysen et al. (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [175] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
- [176] Jameson, BA et al. 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- 10 [177] Raddizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2): 179-89.
- [178] Bublil et al. (2007) *Proteins* 68(1):294-304.
- [179] De Lalla et al. (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [180] Kwok et al. (2001) *Trends Immunol* 22:583-88.
- [181] Brusica et al. (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30.
- 15 [182] Meister et al. (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
- [183] Roberts et al. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
- [184] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
- [185] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
- [186] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
- 20 [187] Welling et al. (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
- [188] Davenport et al. (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
- [189] Tsurui & Takahashi (2007) *J Pharmacol Sci.* 105(4):299-316.
- [190] Tong et al. (2007) *Brief Bioinform.* 8(2):96-108.
- [191] Schirle et al. (2001) *J Immunol Methods.* 257(1-2):1-16.
- 25 [192] Chen et al. (2007) *Amino Acids* 33(3):423-8.
- [193] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30.
- [194] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [195] Caldwell H.D. et al., (1981), *Infect Immun.* 31(3): 1161-1176.
- [196] Montigiani S. et al., (2002), *Infect. Immun.* 70(9): 368-379.
- 30 [197] Maxson and Darwin, (2004), *J. Bacteriol.*, 186(13):4199-4208.
- [198] Klock HE, Lesley SA, (2009) *Methods Mol Biol.*, 498:91-103.
- [199] Berlanda Scorza F. et al., (2008) *Mol. Cell Proteomics*, 7(3): 473-485.
- [200] Bombaci, M. et al., *PLoS ONE*, Jul 4 (2009) (7), pp. 1-10.
- [201] S.-P. Wang, *J. Infect. Dis.* 181 (Suppl 3) (2000), pp. S421-5.

REIVINDICACIONES

1. Una vesícula de membrana externa de una bacteria Gram negativa que es un mutante ompA, que presenta un antígeno heterólogo en su superficie, en la que la bacteria no expresa la proteína OmpA.
- 5 2. La vesícula de membrana externa de acuerdo con la reivindicación 1, que no expresa uno o más componentes del complejo Tol-Pal.
3. La vesícula de membrana externa de acuerdo con la reivindicación 2, que no expresa TolR.
4. La vesícula de membrana externa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que expresa la lipoproteína de Braun *lpp*.
- 10 5. La vesícula de membrana externa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la bacteria es *E. coli*.
6. La vesícula de membrana externa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno heterólogo es de *Chlamydia*.
7. Una composición inmunogénica que comprende una vesícula de membrana externa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 15 8. Una vacuna que comprende una vesícula de membrana externa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 7 o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además uno o más antígenos adicionales en una preparación combinada para la administración simultánea, separada o secuencial.
- 20 10. Una vesícula de membrana externa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 7, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, para uso en el aumento de una respuesta inmunitaria en un mamífero.
- 25 11. Una vesícula de membrana externa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 7, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, para uso en la profilaxis o terapia para elevar anticuerpos que se unen a uno o más epítomos en el antígeno heterólogo que no son inmunoaccesibles y/o no están en su conformación nativa cuando el antígeno heterólogo está presente en una forma purificada.
- 30 12. Una vesícula de membrana externa, una composición inmunogénica o vacuna para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el uso es para elevar una respuesta de anticuerpos neutralizantes.

FIGURA 1

FIG 1A

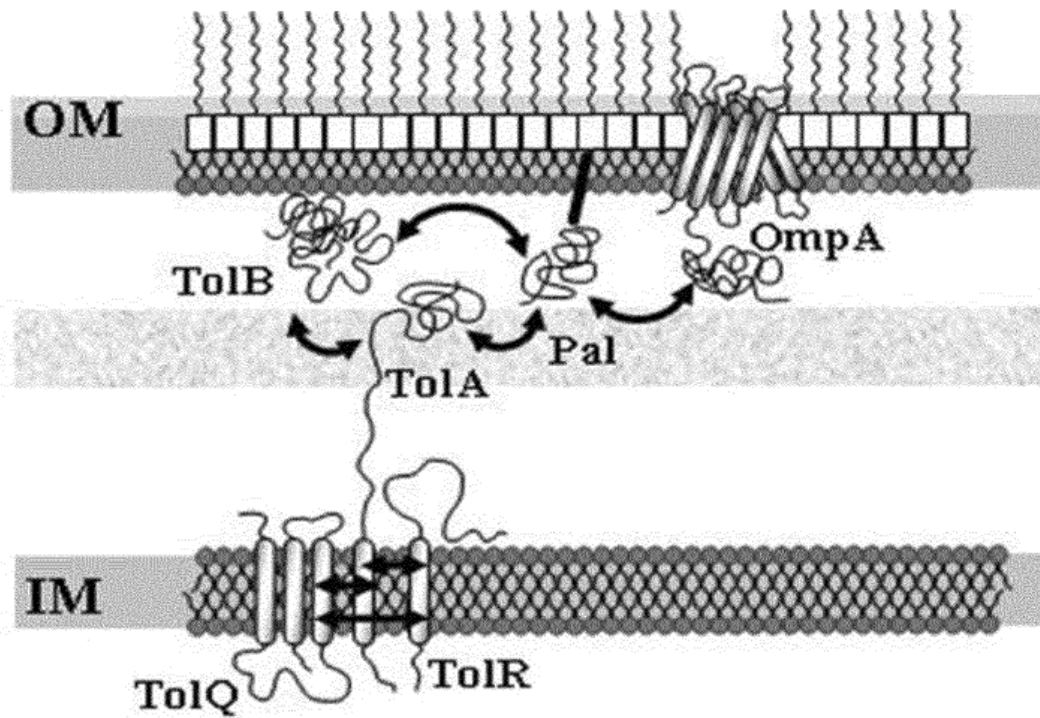


FIG. 1B

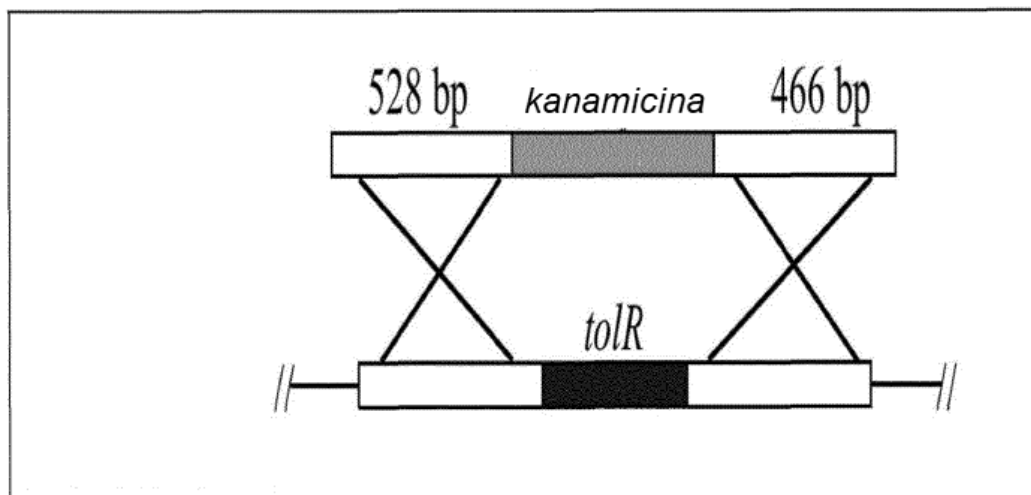


FIGURA 2

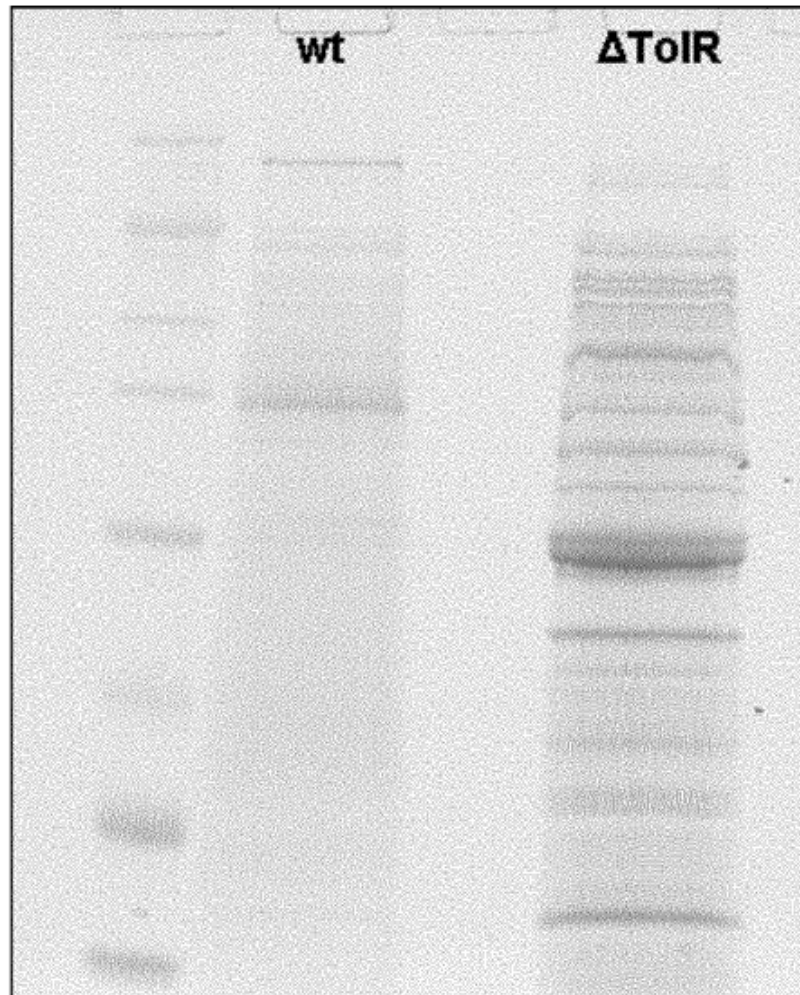


FIGURA 3

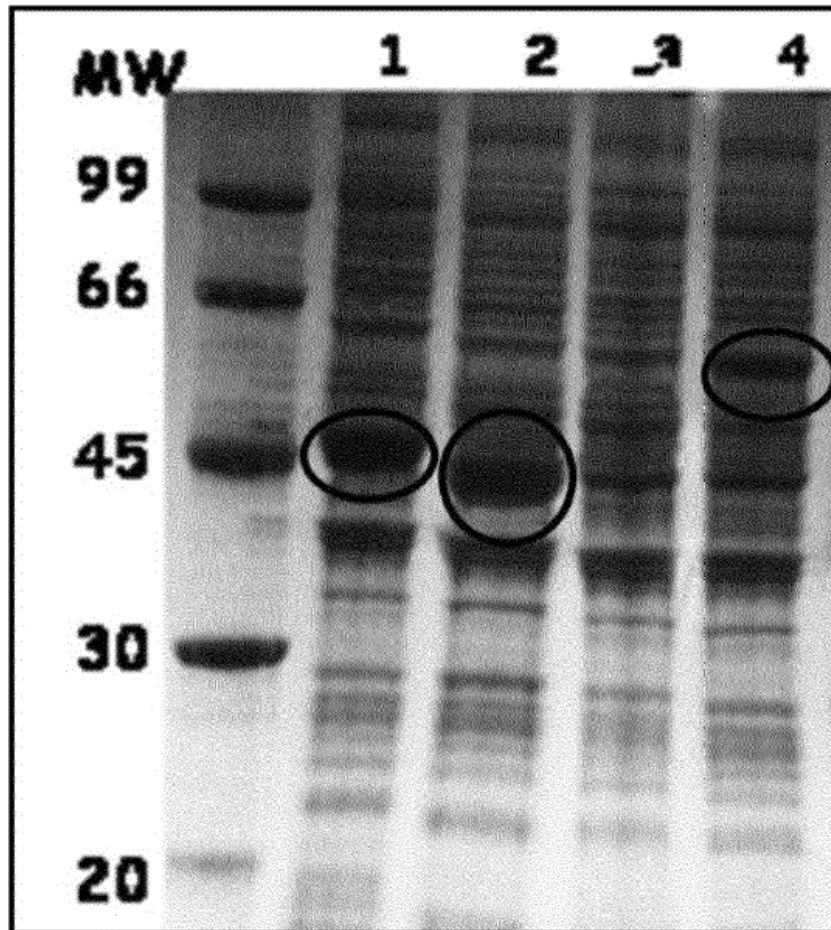


FIGURA 4

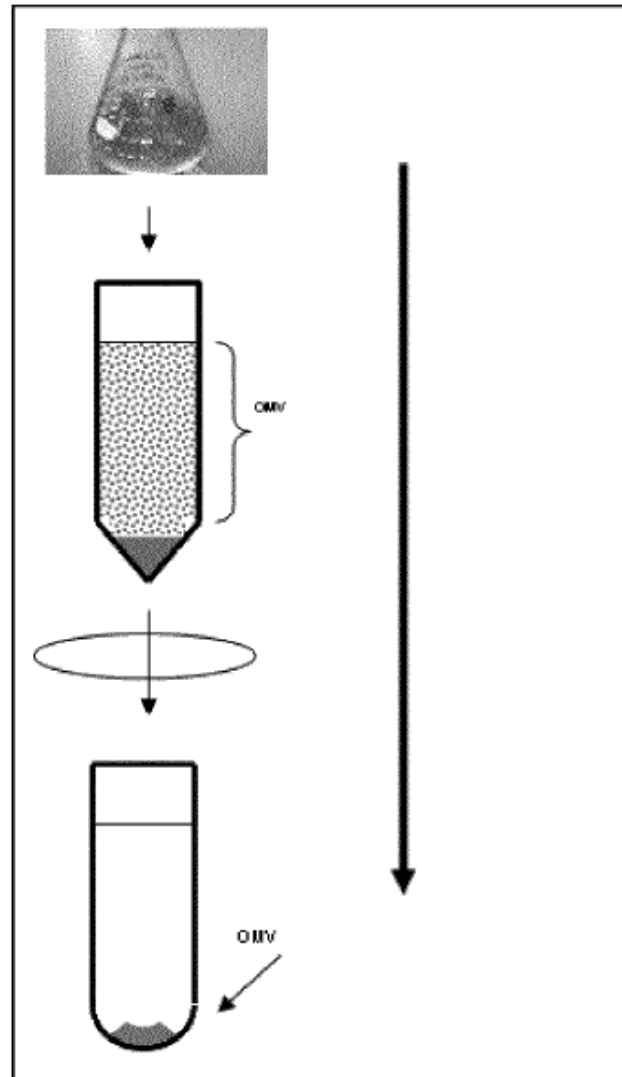


FIGURA 5

FIGURA 5A

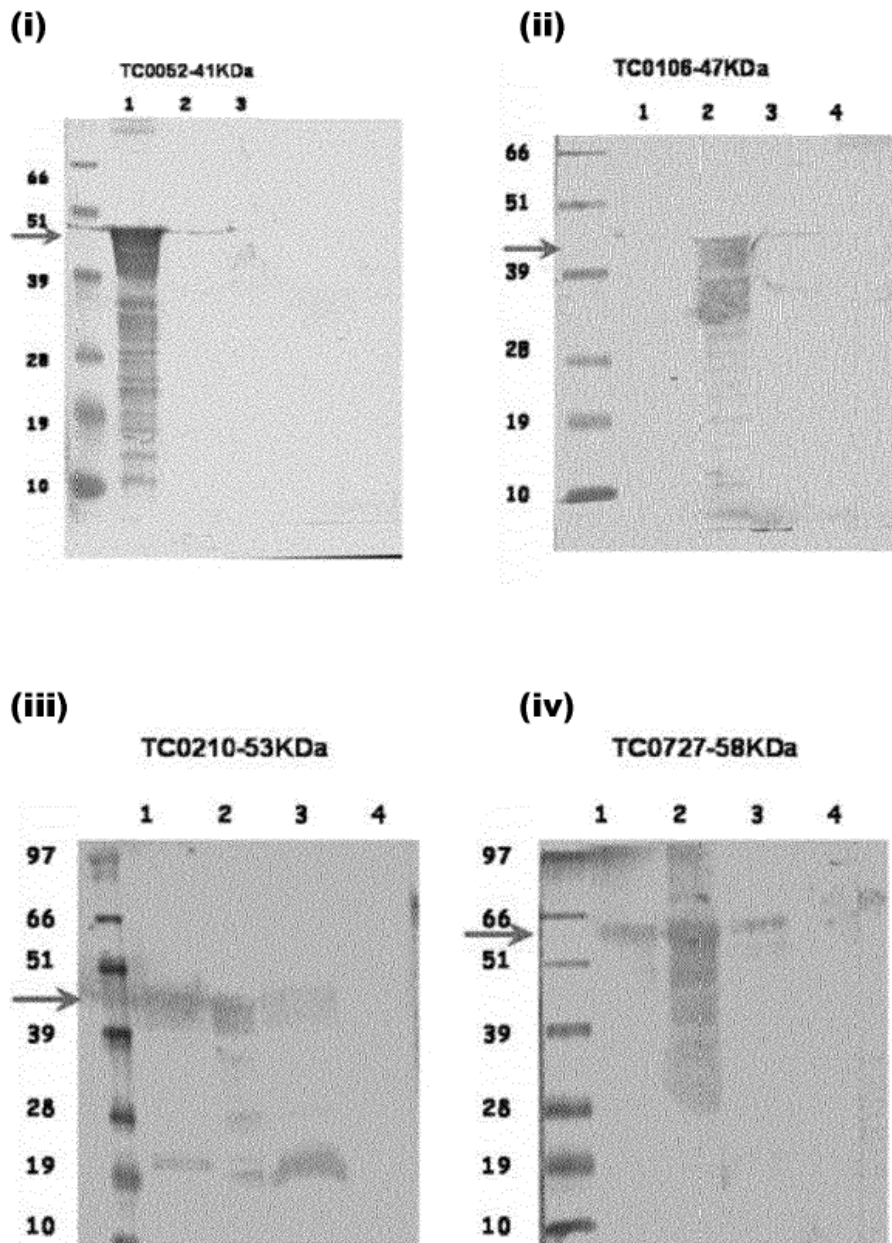


FIGURA 5B

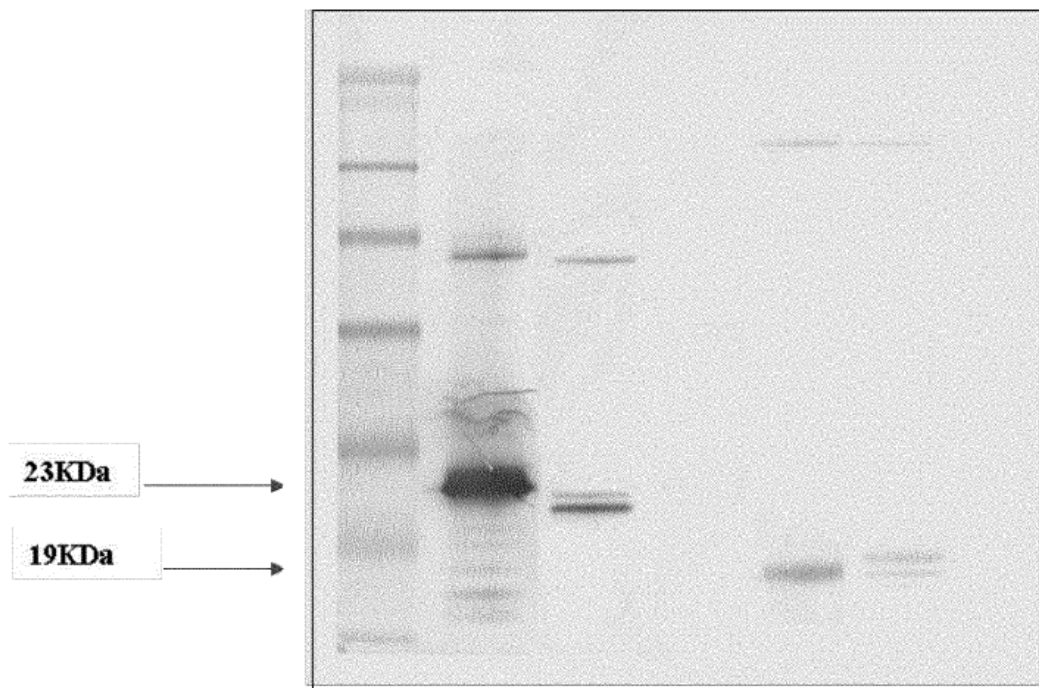


FIGURA 5C

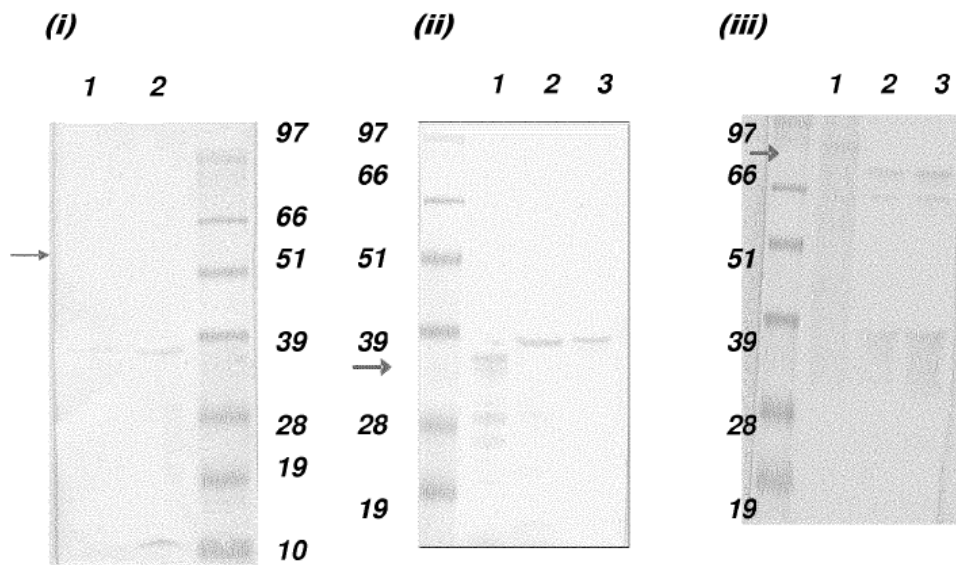
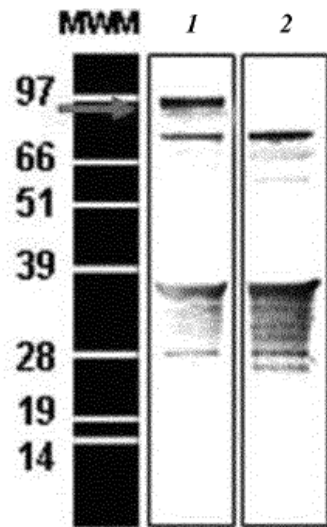


FIGURA 5D

(i)



(ii)

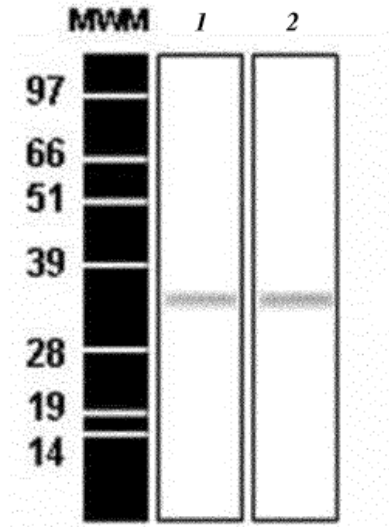


FIGURA 6

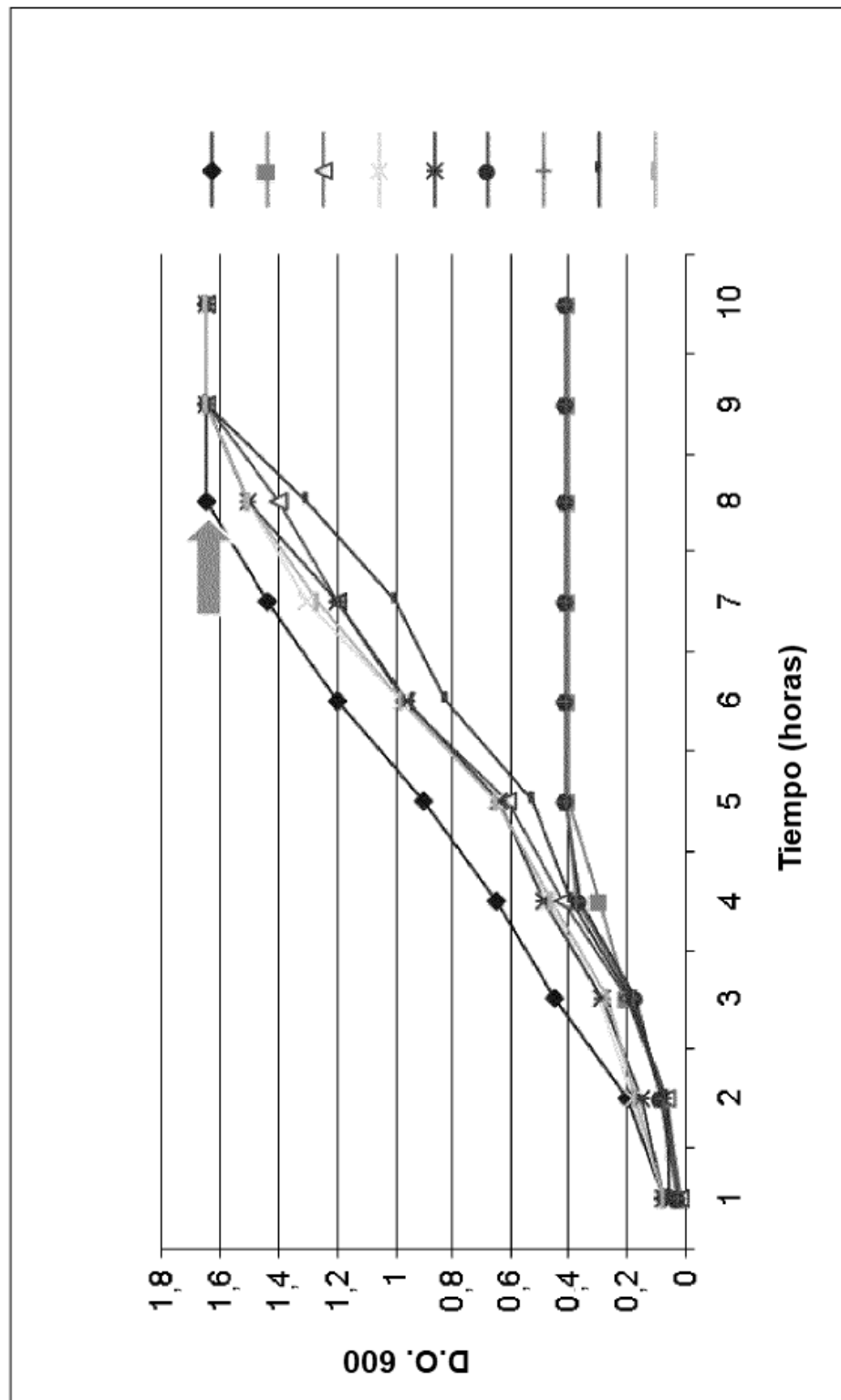


FIGURA 7

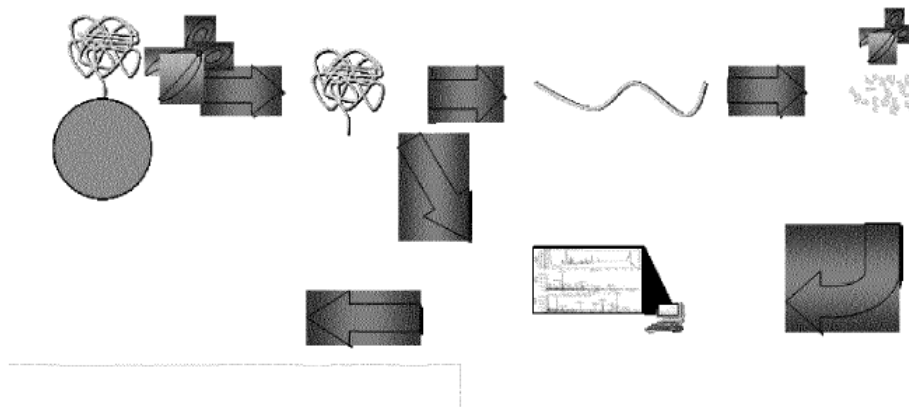


FIGURA 8**RESULTADOS DE BÚSQUEDA DE MASCOT**
VISTA DE PROTEÍNA

Coincidencia con: TC_0210 Puntuación: 43
serina proteasa, familia HtrA/DegQ/DegS (htrA) [3.4.21.-] {Cepa Nigg de Chlamydia muridarum}
 Hallado en búsqueda de \\Chisie06646\MassLynx\PKL_files\Service_OMV_shaving_210_8may2009.pkl

Masa nominal (Mr): 53261; valor pi calculado: 6,36
 Búsqueda NCBI BLAST de TC_0210 contra nr
 Cadena de secuencia no formateada para pegado en otras aplicaciones

Escisión semiespecífica, (el péptido puede ser no específico sólo en un término)
 Escisión por semi Tripsina: cortes en el lado del extremo C-terminal de KR a menos que el residuo siguiente sea P
 Cobertura de Secuencia: 2%

Péptidos coincidentes mostrados en **Negrita**

```

  1 MMKRLLCVLL STSVFSSPML GYSAPKKDSS TGICLAASQS DRELSQEDLL
 51 KEVSRGFSKV AAQATPGVVY IENFPKTGSQ AIASPGNKRG FQENPFYFN
101 DEFFNRFFGL PSHREQPRPQ QRDVVRGTGF IVSEDGYVVT NHHVVEDAGK
151 IHVTLHDGQK YTAKIIGLDP KTDLAVIKIQ AKNLPFLTGF NSDQLQIGDW
201 SIAIGNPFGL QATVTVGVIS AKGRNQLHIV DFEDFIQTDA AINPGNSGGP
251 LLNIDGQVIG VNTAIVSGSG GYIGIGFAIP SLMAKRVIDQ LISDGQVTRG
301 FLGVTLPID SELAACYKLE KVGALITDV VKGSPAEEKAG LRQEDVIVAY
351 NGKEVESLSA LRNAISLMMP GTRVVLKVRV EGKFIEIPVT VTQIPAEDGV
401 SALQKMGVRV QNLTPEICKK LGLASDTRGI FVVSVEAGSP AASAGVVPQQ
451 LILAVNRQRV SSVEELNQVL KNAKGENVLL MVSQGEVIRF VVLKSDE

```

FIGURA 9

>CMU:TC0210 HTRA;SERINA PROTEASA; K01362

PARTE SUPERIOR

LONGITUD = 497

>CTR:CT823 HTRA;SERINA PROTEASA DO; K01362

PARTE SUPERIOR

LONGITUD = 497

PUNTUACIÓN = 931 BITS (2406), PREVISTO= 0.0, PROCEDIMIENTO: AJUSTE POR MATRIZ COMPOSICIONAL
IDENTIDADES= 464/497 (93%), POSITIVAS= 483/497 (97%)

BÚSQUEDA:1 MMKRLLCVLLSTSVFSSPMLGYSAPKKDSSTGICLAASQSDRELSQEDLLKEVSRGFSKV 60
MMKRLLCVLLSTSVFSSPMLGYS K KDS ICLAS D+E+SQEDLLKEVSRGFS+V
OBJETO: 1 MMKRLLCVLLSTSVFSSPMLGYSASKKDSKADICLAVSSGDQEVSQEDLLKEVSRGFSRV 60

BÚSQUEDA: 61 AAQATPGVVYIENFPKGTGQAIASPGNKRGFQENPFDFNDEFFNRFFGLPSHREQPRPQ 120
AA+ATPGVVYIENFPKGTG+QAIASPGNKRGFQENPFDFNDEFFNRFFGLPSHREQ RPQ
OBJETO: 61 AAKATPGVVYIENFPKGTGNQAIASPGNKRGFQENPFDFNDEFFNRFFGLPSHREQQRPQ 120

BÚSQUEDA:121 QRDAVRGTGFIVSEGDYVVTNHHVVEDAGKIHVTLHDGQKYTAKIIGLDPKTDLAVIKIQ 180
QRDAVRGTGFIVSEGDYVVTNHHVVEDAGKIHVTLHDGQKYTAKI+GLDPKTDLAVIKIQ
OBJETO: 121 QRDAVRGTGFIVSEGDYVVTNHHVVEDAGKIHVTLHDGQKYTAKIVGLDPKTDLAVIKIQ 180

BÚSQUEDA:181 AKNLPFLTFGNSDQLQIGDWSIAIGNPFGLQATVTVGVISAKGRNQLHIVDFEDFIQTDA 240
A+ LPFLTFGNSDQLQIGDW+IAIGNPFGLQATVTVGVISAKGRNQLHIVDFEDFIQTDA
OBJETO: 181 AEKLPFLTFGNSDQLQIGDWAIAIGNPFGLQATVTVGVISAKGRNQLHIVDFEDFIQTDA 240

BÚSQUEDA:241 AINPGNSGGPLLNDGQVIGVNTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMAKRVIDQLISDGQVTRG 300
AINPGNSGGPLLNI+QVIGVNTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMAKRVIDQLISDGQVTRG
OBJETO: 241 AINPGNSGGPLLNINGQVIGVNTAIVSGSGGYIGIGFAIPSLMAKRVIDQLISDGQVTRG 300

BÚSQUEDA:301 FLGVTLQPIDSELAACYKLEKVY GALITDVVKGSPA EKAGLRQEDVIVAYNGEVESLSA 360
FLGVTLQPIDSELA CYKLEKVY GAL+TDVVKGSPA EKAGLRQEDVIVAYNGEVESLSA
OBJETO: 301 FLGVTLQPIDSELATCYKLEKVY GALVTDVVKGSPA EKAGLRQEDVIVAYNGEVESLSA 360

BÚSQUEDA:361 LRNAISLMPGTRVVLKV VREGKFIEIPVTVTQIPAEDGVSA LQKMGVRVQNLTPEICKK 420
LRNAISLMPGTRVVLK+VREGK IEIPVTVTQIP EDGVSA LQKMGVRVQN+TPEICKK
OBJETO: 361 LRNAISLMPGTRVVLKIVREGKTIEIPVTVTQIPTEDGVSA LQKMGVRVQNITPEICKK 420

BÚSQUEDA:421 LGLASDTRGIFVVSVEAGSPAASAGVPGQLILAVNRQRVSSVEELNQVLKNAKGENVLL 480
LGLA+DTRGI VV+VEAGSPAASAGV PGQLILAVNRQRV+SVEELNQVLKN+KGENVLL
OBJETO: 421 LGLAADTRGILVVAVEAGSPAASAGVAPGQLILAVNRQRVASVEELNQVLKNSKGENVLL 480

BÚSQUEDA:481 MVSQGEVIREFVVLKSDE 497
MVSQG+V+RF+VLKSDE
OBJETO: 481 MVSQGDVVRFIVLKSDE 497

FIGURA 10

FIGURA 10A

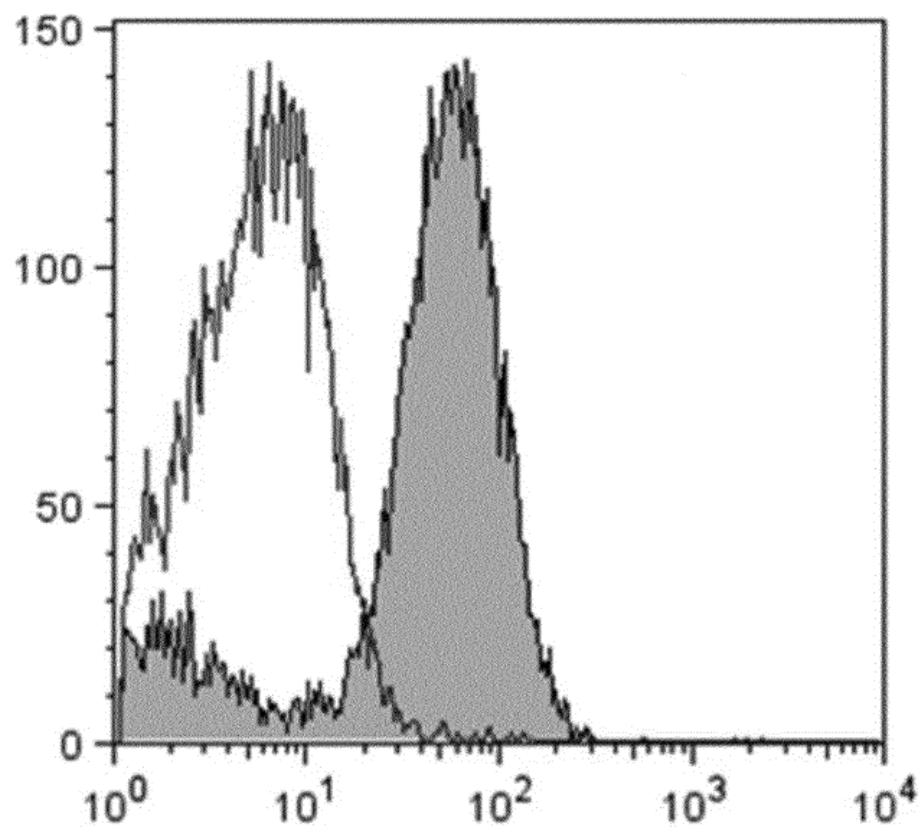


FIGURA 10B

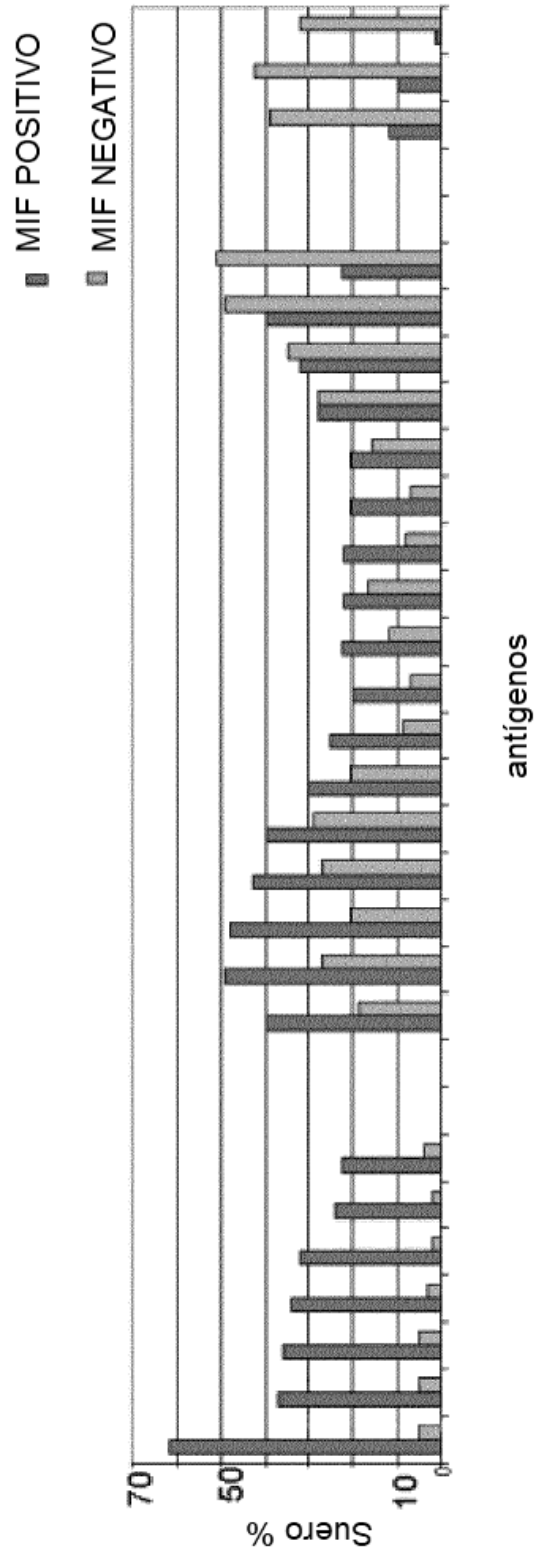


FIGURA 10C

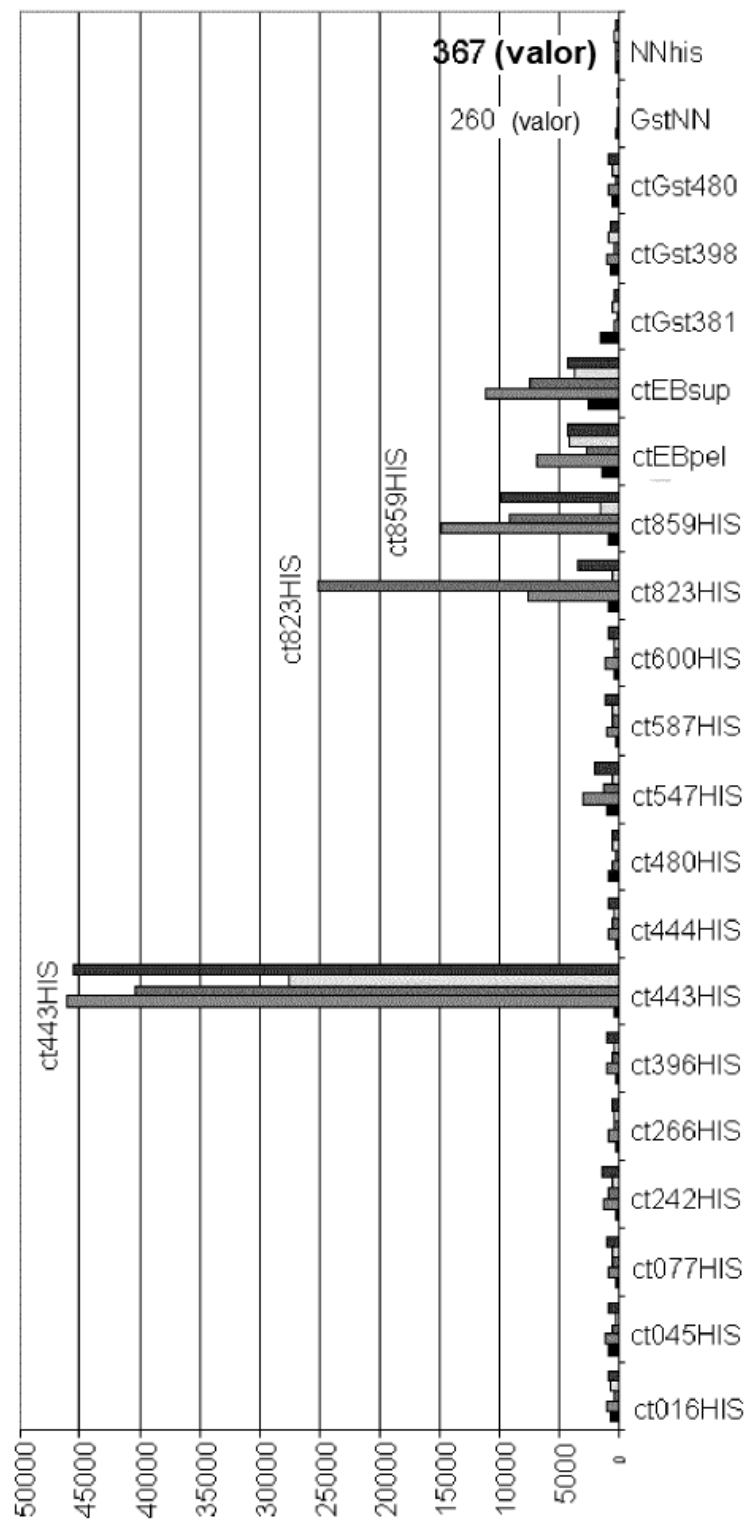


FIGURA 10D

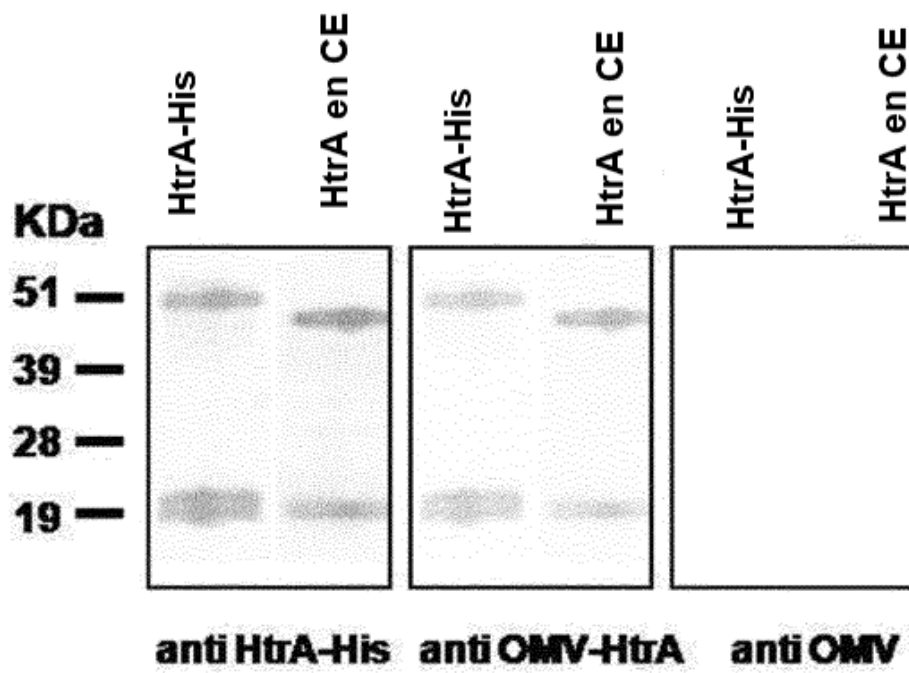


FIGURA 10E

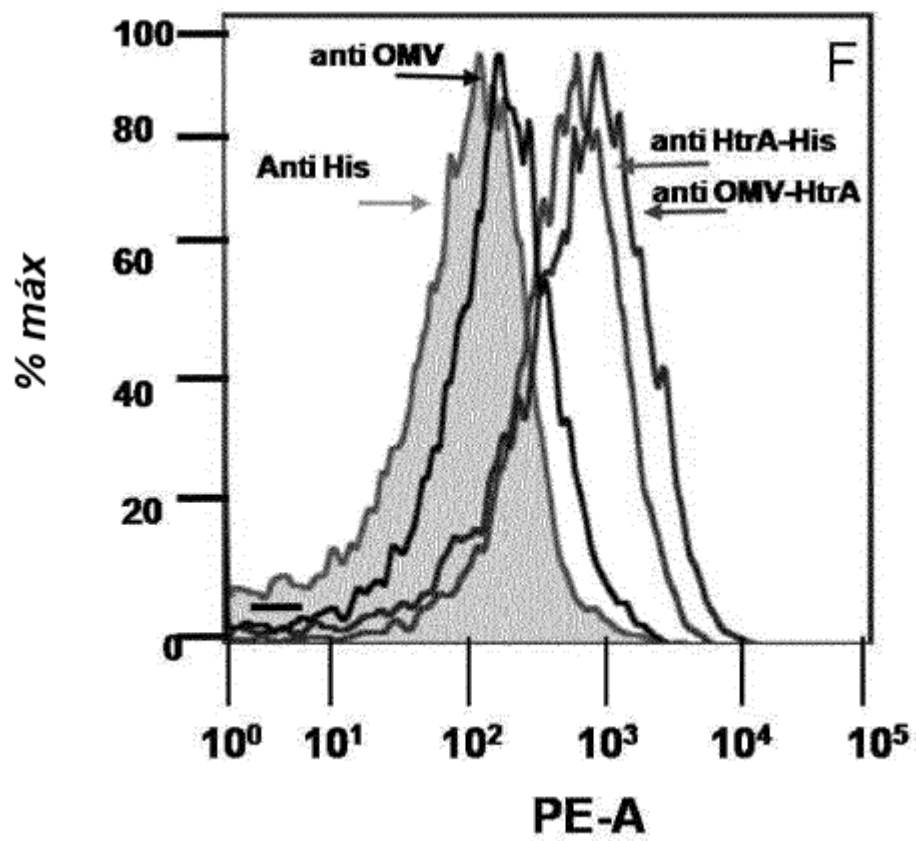


FIGURA 11

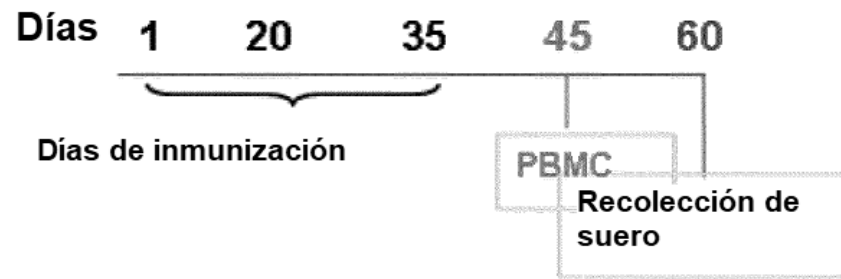


FIG. 12
ensayo de neutralización

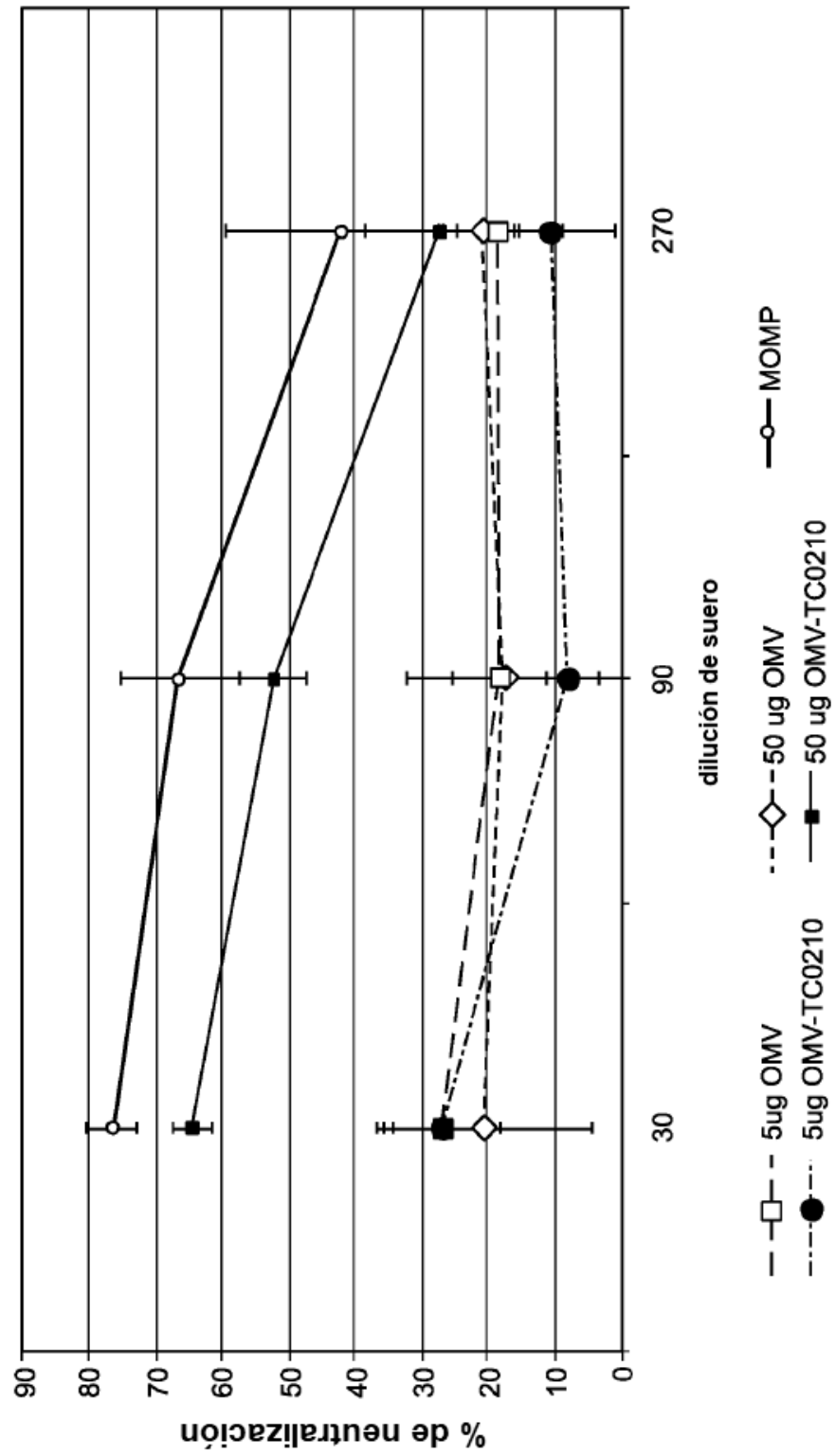


FIGURA 13

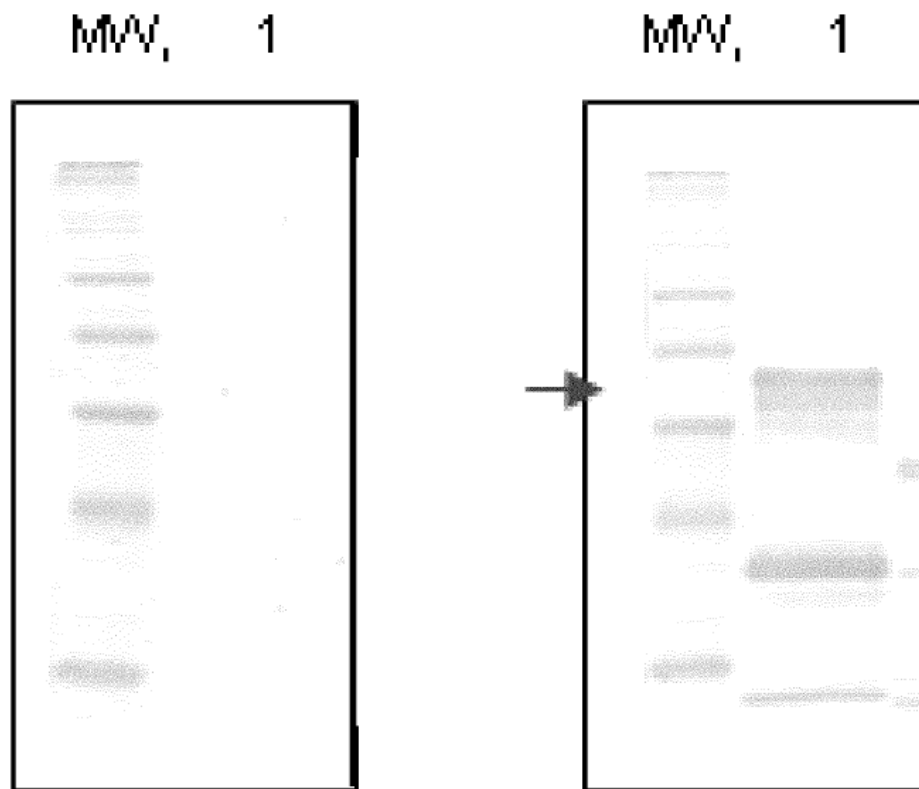


FIGURA 14

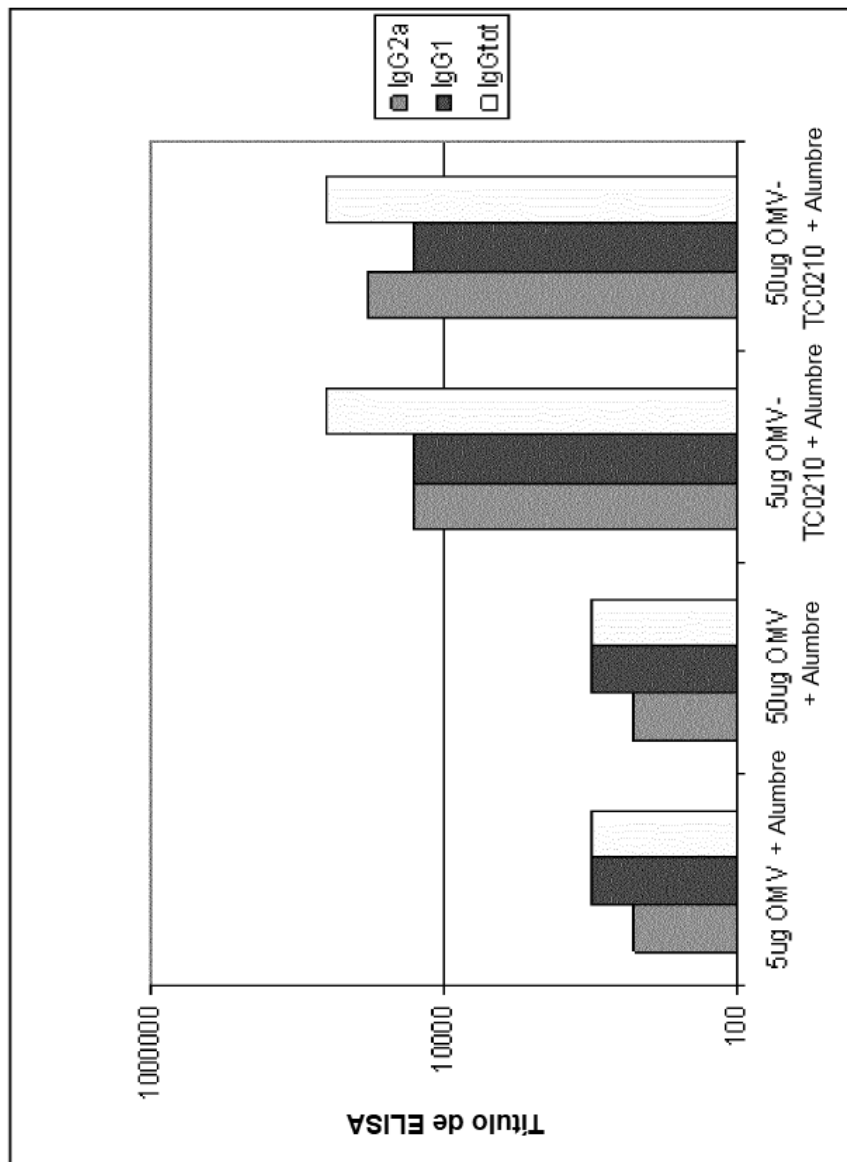


FIGURA 15

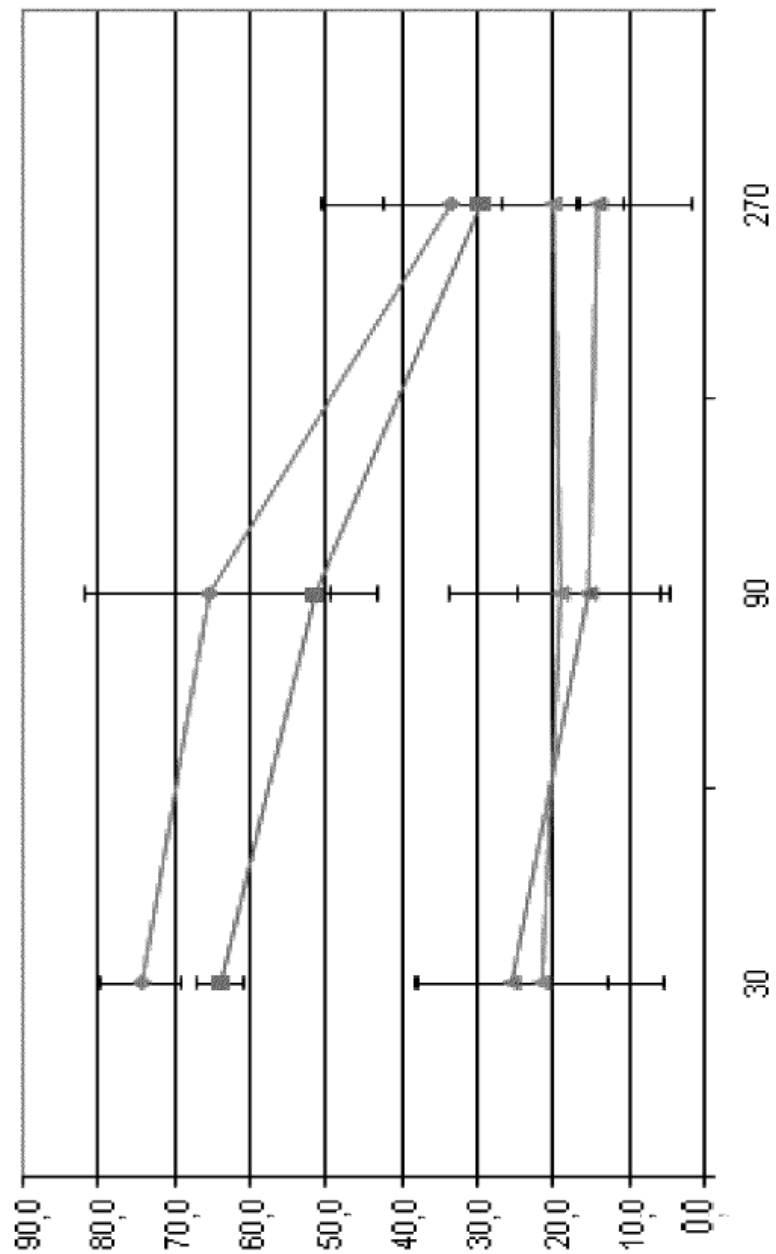


FIGURA 16

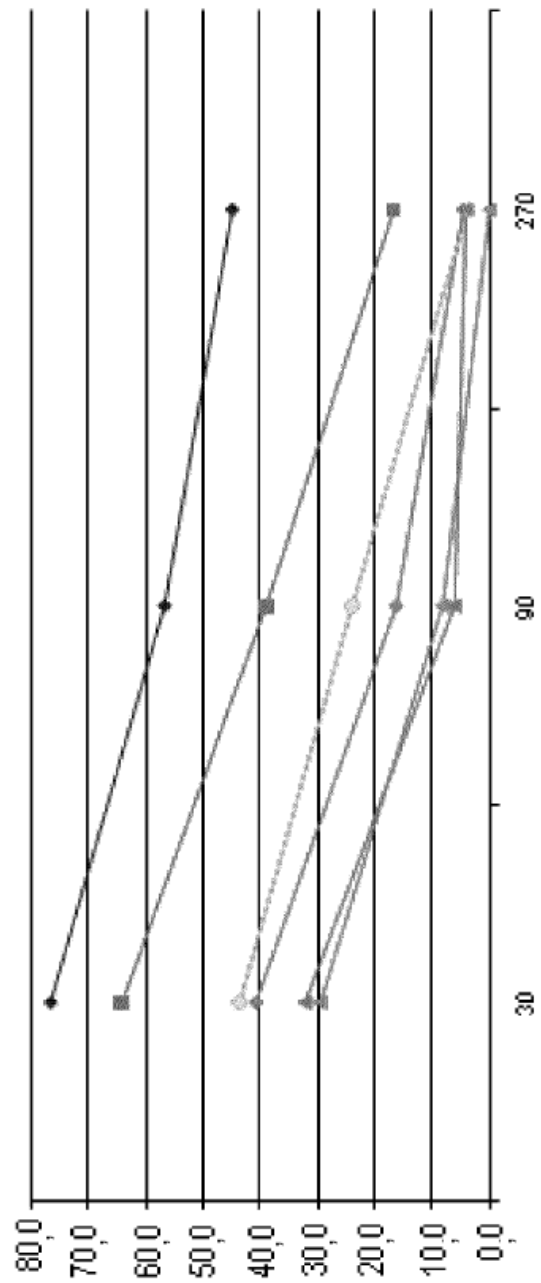


FIGURA 17A

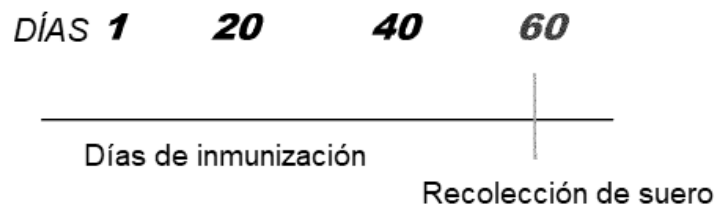


FIGURA 17B

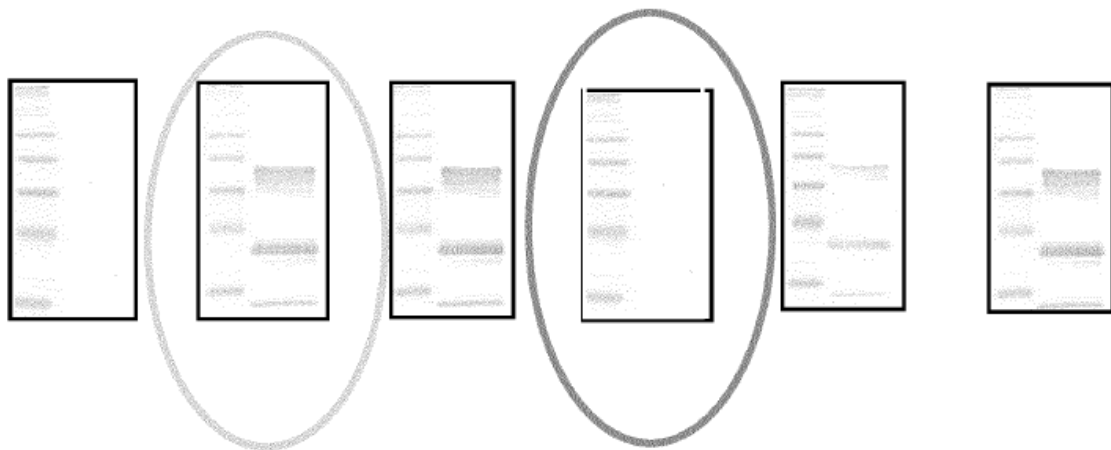


FIGURA 17C

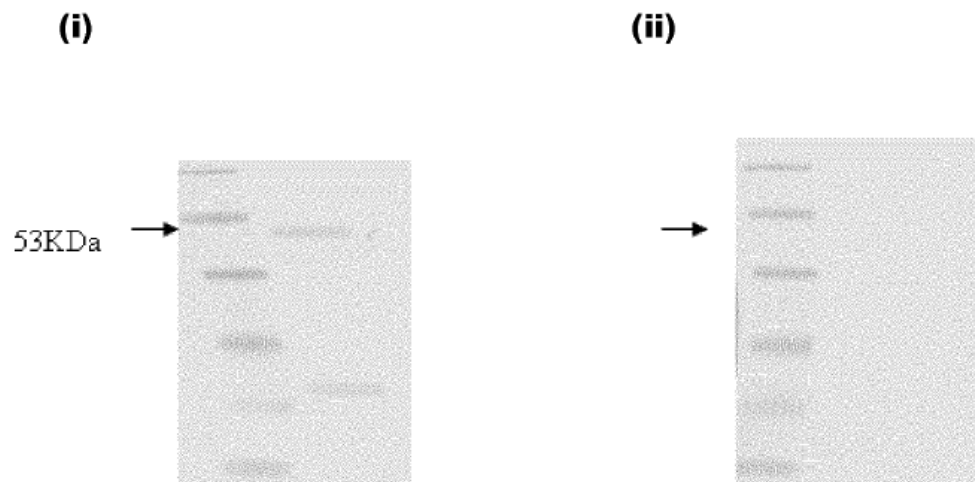


FIGURA 18

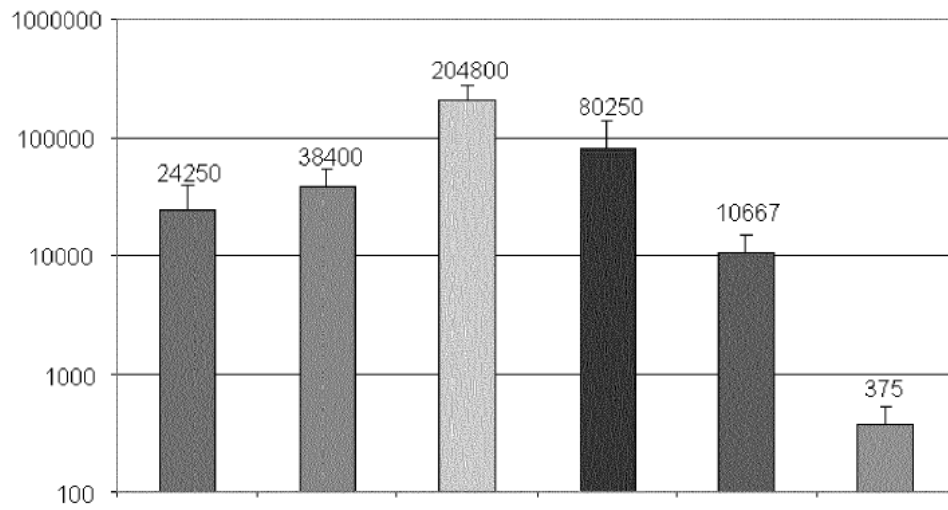


FIGURA 19

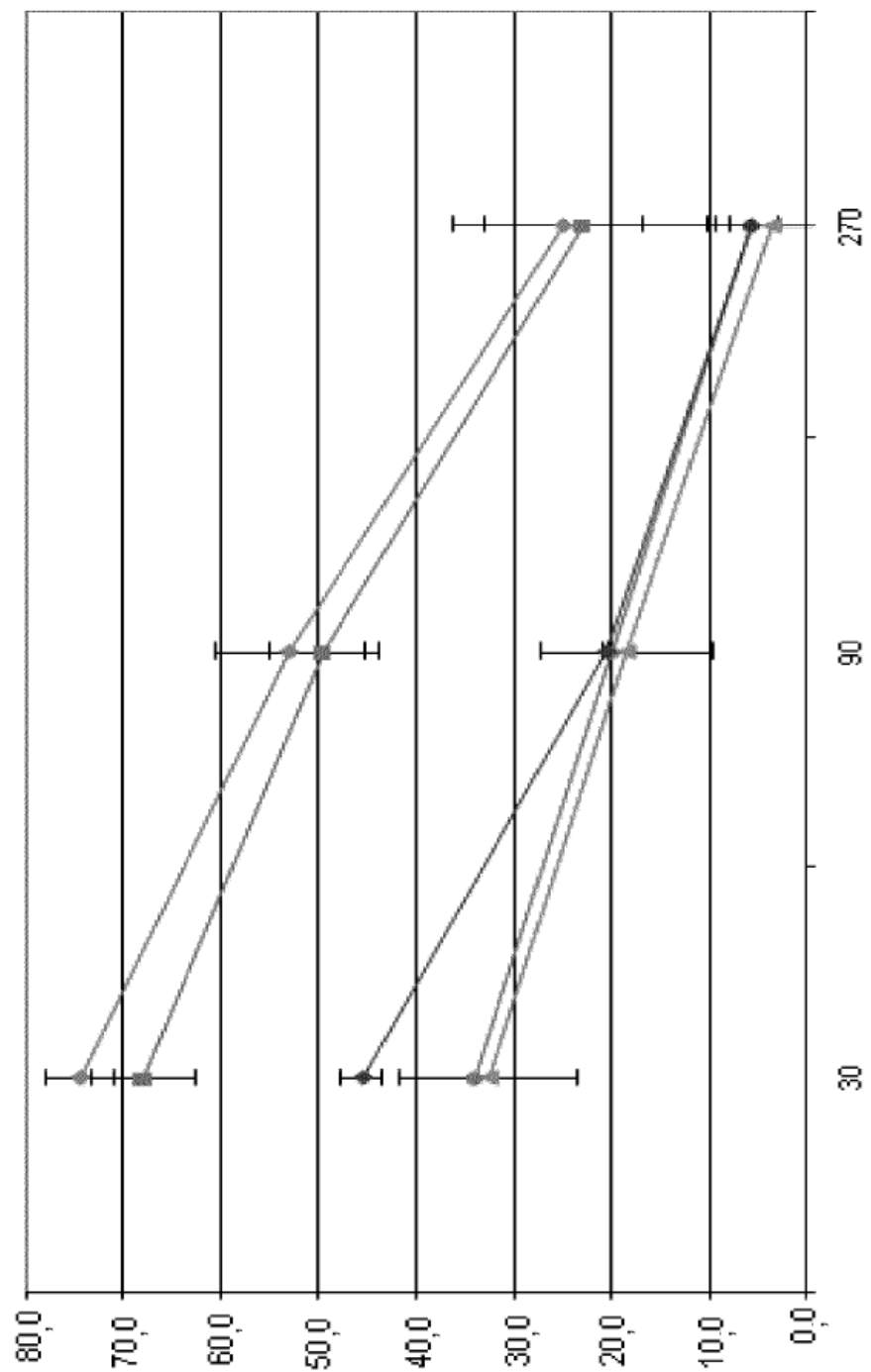


FIGURA 20

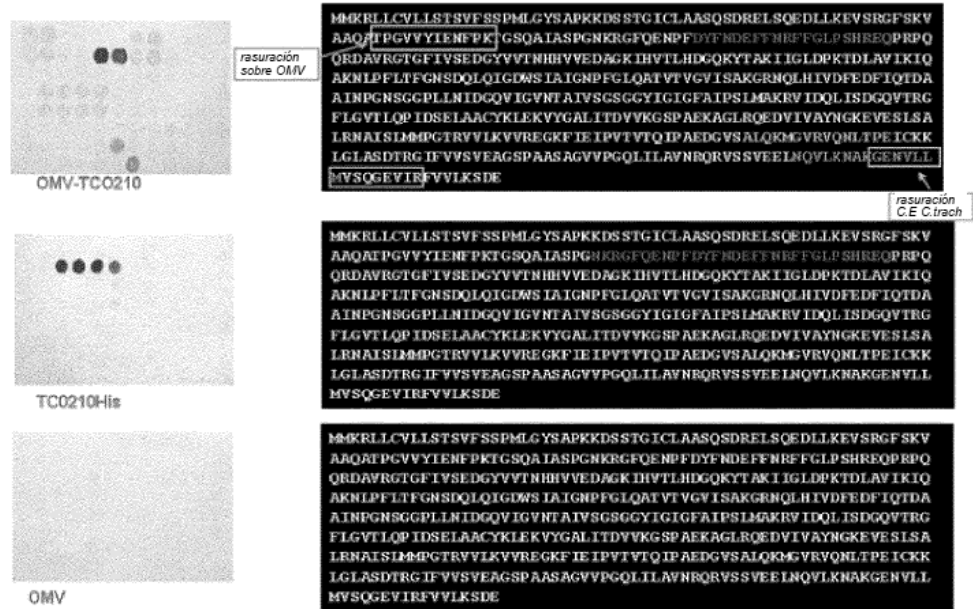
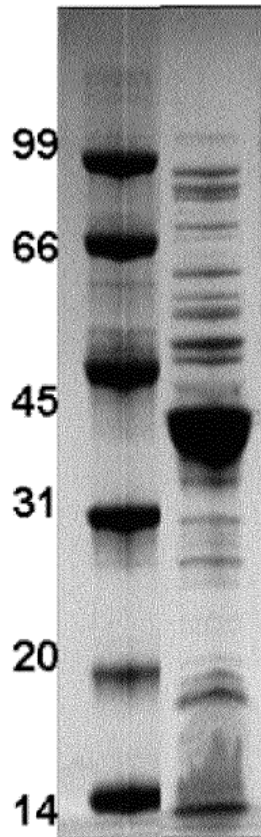


FIGURA 21

(i)



(ii)

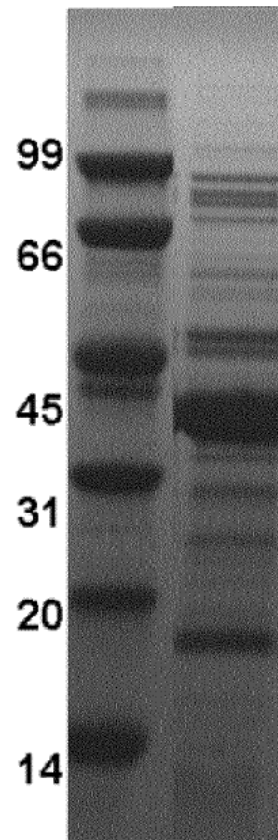


FIGURA 22

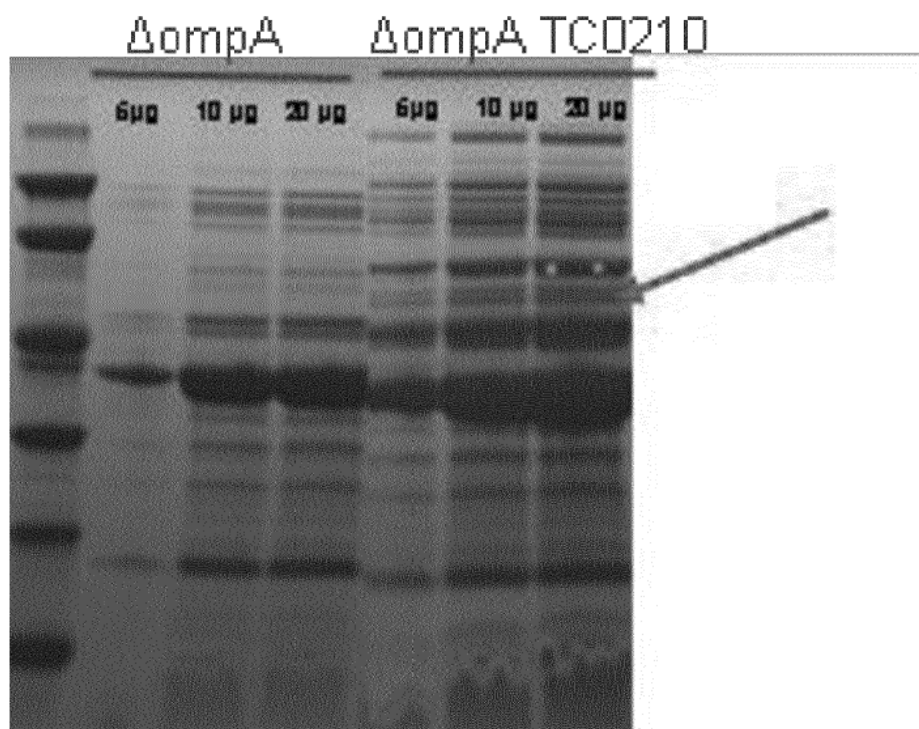


FIGURA 23Coincidencia con: **TC_0210** Puntuación: 102 Previsto: 2.3e-006**serina proteasa, familia HtrA/DegQ/DegS (htrA) [3.4.21.-] {Cepa Nigg de Chlamydia muridarum}**Masa nominal (Mr): **53261**; valor pl calculado: **6,36**Búsqueda NCBI BLAST de **TC_0210** contra nr

Modificaciones variables: Oxidación (M)

Escisión por Tripsina: cortes en el lado del extremo C-terminal de KR a menos que el residuo siguiente sea P

Número de valores de masa buscados: **57**Número de valores de masa coincidentes: **13**Cobertura de Secuencia: **34%**Péptidos coincidentes mostrados en **Negrita**

```

1 MMKRLLCVLL STSVFSSPML GYSAPKKDSS TGICLAASQS DRELSQEDLL
51 KEVSRGFSKV AAQATPGVVY IENFPKTGSQ AIASPGNKRG FQENPFDYFN
101 DEFFNRFFGL PSHREQPRPQ QRDVAVRGTGF IVSEDGYVVT NHHVVEDAGK
151 IHVTLHDGQK YTAKIIGLDP KTDLAVIKIQ AKNLPFLTFG NSDQLQIGDW
201 SIAIGNPFGL QATVTVGVIS AKGRNQLHIV DFEDFIQTDA AINPGNSGGP
251 LLNIDGQVIG VNTAIVSGSG GYIGIGFAIP SLMAKRVIDQ LISDGQVTRG
301 FLGVTLPID SELAACYKLE KVGALITDV VKGSPAEKAG LRQEDVIVAY
351 NGKEVESLSA LRNAISLMMP GTRVVLKVVR EGKFIEIPVTQIPAEDGV
401 SALQKMGVRV QNLTPEICKLGLASDTRGI FVVSVEAGSP AASAGVVPGQ
451 LILAVNRQRV SSVEELNQVL KNAKGENVLL MVSQGEVIRF VVLKSDE

```

Inicio - Fin	Observado	Mr(prev.)	Mr(calc.)	ppm	Secuencia Perdida
60 - 76	1803.89	1802.88	1802.96	-41	0 K.VAAQATPGVVYIENFPK.T
90 - 106	2185.96	2184.96	2184.92	17	0 R.GFQENPFDFNDEFFNR.F
107 - 114	960.43	959.42	959.50	-76	0 R.FFGLPSHR.E
115 - 122	1038.46	1037.45	1037.54	-81	0 R.EQPRPQQR.D
127 - 150	2530.42	2529.42	2529.21	80	0 R.GTGFI VEDGYVVTNHHV VEDAGK.I
172 - 182	1199.55	1198.55	1198.73	-152	1 K.TDLAVIK IQAK .N
287 - 299	1443.67	1442.66	1442.77	-78	0 R.VIDQLISDGQVTR.G
339 - 353	1632.76	1631.75	1631.86	-67	1 K.AGLRQEDVIVAYNGK.E
339 - 362	2617.63	2616.63	2616.39	91	2 K.AGLRQEDVIVAYNGKEVESLSALR.N
384 - 405	2355.39	2354.38	2354.27	45	0 K.FIEIPVTVTQIPAE DGV SALQK.M
410 - 419	1144.52	1143.51	1143.60	-73	0 R.VQNL TPEICK .K
472 - 489	1973.00	1971.99	1972.04	-26	1 K.NAKGENVLL MVSQ GEVIR.F Oxidación (M)
475 - 489	1659.77	1658.77	1658.87	-61	0 K.GENVLL MVSQ GEVIR.F Oxidación (M)

SIN COINCIDENCIA A: 650.21, 656.18, 672.07, 697.35, 741.33, 777.37, 785.37, 861.00, 964.39, 986.43, 1002.43, 1111.49, 1155.52, 1170.52, 1243.57, 1249.46, 1287.59, 1295.51, 1331.61, 1333.59, 1367.62, 1375.63, 1388.63, 1580.64, 1717.72, 1745.71, 1763.84, 1825.89, 1847.82, 1904.86, 1932.88, 1954.02, 1974.94, 2034.92, 2149.07, 2240.07, 2275.26, 2378.32, 2553.36, 2619.60, 2645.60, 2916.71, 2970.85, 3217.98