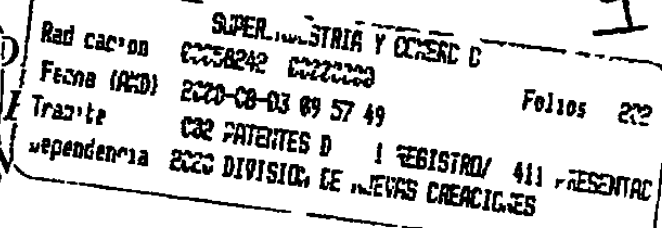
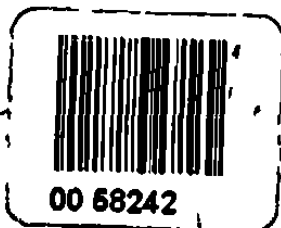




REPÚBLICA DE COLOMBIA



SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA
Y COMERCIO



DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S A

No de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

GERMAN CASTILLO GRAU

País de Domicilio

Bélgica

Departamento o Estado

Dirección

Ciudad

Rixensart

Telefono

(74) DATOS DEL APODERADO

PODER No 16 769

Nombre

GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección y Domicilio

Carrera 13 No 37-43, Piso 12

Ciudad

Santafé de Bogotá, D C

Teléfono

2857460

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Ver lista adjunta

Identificación

Dirección

Ver lista adjunta

Ciudad

Telefono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

Título de la Invención

~~COMPOSICIONES DE VACUNA~~

CONDICIONES PARA VACUNAS

QUE INCLUYEN AMPOLLETAS A PARTIR DE CEPAS GRAM-
NEGATIVAS GENETICAMENTE MODIFICADAS Y SU PREPARACION

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☐

(33) País Gran Bretaña

(32) Fecha

Agosto 3, 1999

(31) No Solicitud

GB 9918319 6

Fuente Convención de París

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☐ 18 meses

a partir de la fecha de la presente solicitud

CLASIFICACION INTERNACIONAL

C12 N15/00 , C12 N9/09 , A61K 39/02

INVENTORES

Francois-Xavier Jacques BERTHET
(Rixensart, Bélgica)

Wilfried L J DALEMANS
(Rixensart, Bélgica)

Philippe DENOEL
(Rixensart, Bélgica)

Guy DEQUESNE
(Rixensart, Bélgica)

Christiane FERON
(Rixensart, Bélgica)

Yves LOBET
(Rixensart, Bélgica)

Jan POOLMAN
(Rixensart, Bélgica)

Georges THIRY
(Rixensart, Bélgica)

Joselle THONNARD
(Rixensart, Bélgica)

Pierre VOET
(Rixensart, Bélgica)

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una vacuna de ampollas Gram negativa inmunoprotectora y no tóxica adecuada para uso pediátrico Ejemplos de cepas Gram negativas de las que se preparan las ampollas son *N meningitidis*, *M catarrhalis* y *H influenzae* Las ampollas de la invención se mejoran mediante uno o más cambios genéticos en el cromosoma de la bacteria, incluyendo la sobrerregulación de los antígenos protectores subrregulación de los antígenos inmunodominantes no protectores y detoxificación del resto Lípido A de LPS

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☒
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☒
Recibo de la tasa respectiva	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina	☐
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista	☒
Copia certificada de la primera solicitud	☐
Nota Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	☐
Traducción simple	☒
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☒
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE GERMAN CASTILLO GRAU

CC 17 017 671 de Bgtá 1 P No 2978



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT 800176089-

RECIBO OFICIAL DE CAJA 47 891
FECHA AGOSTO 1 DE 2000

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO	
Radicacion	63058242 CCCCCC
Fecha (AXD)	2000-08-03 09 57 49
Tramite	632 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia	2020 DIVISION DE JUELAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

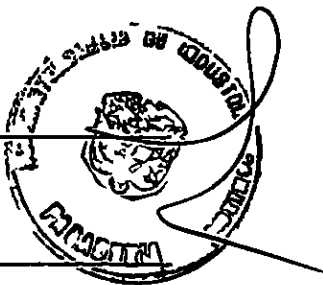
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No PAGO	Vr PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2885947	5 213 000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	608 000 00
		TOTAL	\$ 608 000 00

SON SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No

Carrera 13 No 27 00 Pisos 5 y 10
Conmutador 334 12 21
Fax 281 31 25
Santa Fe de Bogota D C Colombia

COMPOSICIONES DE VACUNA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invencion se refiere el campo de las composiciones de vacuna bacterianas Gram negativas, a su fabricacion y al uso de dichas composiciones en medicina Más particularmente, se refiere al campo de nuevas vacunas de vesiculas de membrana externa (o ampollas) y a procedimientos ventajosos para hacer estas vacunas más efectivas y seguras

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las bacterias Gram negativas estan separadas del medio externo por dos capas sucesivas de estructuras de membrana Estas estructuras, referidas como la membrana citoplasmatica y la membrana externa (ME), difieren tanto estructural como funcionalmente La membrana externa juega un papel importante en la interacción de las bacterias patógenas con sus respectivos huéspedes Consiguientemente, las moléculas bacterianas expuestas a la superficie representan importantes objetivos para la respuesta inmune del huesped, haciendo a los componentes de la membrana externa atractivos candidatos para proporcionar vacunas, reactivos de diagnostico y terapeuticos

Las vacunas bacterianas de células enteras (muertas o atenuadas) tienen la ventaja de suministrar múltiples antígenos en su microambiente natural Los inconvenientes de esta aproximación son los efectos secundarios inducidos por componentes bacterianos como endotoxinas y fragmentos de peptidoglicanos Por otro lado, las vacunas de subunidades acelulares que contienen componentes purificados de la membrana

6

externa pueden suministrar solo una proteccion limitada y pueden no presentar los antigenos adecuadamente al sistema inmune del huésped

Las proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos son los tres constituyentes principales encontrados en la membrana externa de todas las bacterias Gram negativas. Estas moléculas se distribuyen asimétricamente: fosfolípidos de membrana (principalmente en la lámina interna), lipooligosacáridos (exclusivamente en la lámina externa) y proteínas (lipoproteínas de las láminas interna y externa, proteínas de membrana integrales o politópicas). Para muchos patógenos bacterianos que tienen impacto sobre la salud humana se ha mostrado que los lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa son inmunogénicos y tratables para conferir protección contra la correspondiente enfermedad por medio de inmunización.

La ME de las bacterias Gram negativas es dinámica y, dependiendo de las condiciones ambientales, puede experimentar transformaciones morfológicas drásticas. Entre estas manifestaciones se ha estudiado y documentado la formación de vesículas de membrana externa o "ampollas" en muchas bacterias Gram negativas (Zhou, L et al, 1998, *FEMS Microbiol Lett* 163 223-228). Entre estas, una lista no exhaustiva de patógenos bacterianos de los que se ha informado que producen ampollas incluye *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica*. Aunque el mecanismo bioquímico responsable de la producción de

2

ampollas de ME no se conoce totalmente, estas vesículas de membrana externa se han estudiado extensamente, ya que representan una poderosa metodología para aislar preparaciones de proteína de membrana externa en su conformación nativa. En ese contexto, el uso de preparaciones de membrana externa es de interés particular para desarrollar vacunas contra *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Chlamydia*. Además, las ampollas de membrana externa combinan múltiples antígenos proteínicos y no proteínicos que es probable que confieran una extensa protección contra variantes intraespecie.

En comparación con los otros tipos de vacunas de bacteria, más ampliamente utilizados (vacunas bacterianas de células enteras y vacunas de subunidades purificadas), los inventores mostrarán que las vacunas de ampollas de membrana externa (modificadas de ciertas maneras) pueden representar el compromiso ideal.

El uso ampliamente extendido de vacunas de subunidades bacterianas se ha debido al estudio intensivo de las proteínas de superficie bacterianas que se han encontrado útiles en aplicaciones de vacuna [por ejemplo pertactina de *B. pertussis*]. Estas proteínas están asociadas relajadamente con la membrana externa bacteriana y pueden purificarse a partir del sobrenadante de cultivo o extraerse fácilmente de las células bacterianas. Sin embargo, se ha mostrado que las proteínas de membrana externa integrales estructurales son también antígenos protectores. Son ejemplos PorA de *N. meningitidis* serogrupo B, D15 de *Haemophilus influenzae*, OMP CD de *M. catarrhalis* y OMP F de *P. aeruginosa*. Dichas proteínas tienen sin embargo

cf

características estructurales bastante específicas, particularmente láminas β anfipáticas múltiples, que complican su uso directo como vacunas de subunidades (recombinantes) purificadas

5 Además, se ha observado claramente que son necesarias vacunas de componentes múltiples (en términos de proteínas de superficie bacteriana y proteínas de membrana integrales) para suministrar un nivel razonable de protección. Por ejemplo, en el caso de vacunas de subunidades de *B. pertussis*, las vacunas multicomponente son superiores a los productos mono o bicomponente

10 Para incorporar proteínas de membrana externa integrales en dicho producto de subunidades, debe estar presente un plegamiento conformacional nativo (o casi nativo) de las proteínas en el producto para tener un efecto inmunológico útil. El uso de vesículas de membrana externa excretadas o ampollas puede ser una solución elegante para el problema de incluir proteínas de membrana integrales protectoras en una vacuna de subunidades, asegurando mientras que se pliegan apropiadamente

15 El serogrupo B de *N. meningitidis* (menB) excreta ampollas de membrana externa en cantidades suficientes para permitir su fabricación a escala industrial. Dichas vacunas de proteínas de membrana externa multicomponente a partir de cepas menB de origen natural se ha encontrado que son eficaces para proteger a adolescentes de enfermedades de menB y se han registrado en Latinoamérica. Un procedimiento alternativo de preparar vesículas de membrana externa es a través del proceso de extracción con detergente de las células bacterianas (documento EP 11243)

A

Los ejemplos de las especies bacterianas de las que pueden prepararse vacunas de ampollas son los siguientes

Neisseria meningitidis

5 *Neisseria meningitidis* (meningococo) es una bacteria Gram negativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. Ocasionalmente produce enfermedades bacterianas invasivas como bacteremia y meningitis. La incidencia de la enfermedad meningococcica muestra diferencias geograficas estacionales y anuales (Schwartz, B , Moore, P S , Broome, C V , Clin Microbiol Rev 2 (suplemento), paginas 18-24, 1989). La
10 mayoría de las enfermedades en los paises templados se debe a cepas del serogrupo B y varia en incidencia de 1-10/1000 000/año de la población total, alcanzando a veces valores mayores
15 (Kaczmariski, E B (1997), Commun Dis Rep Rev 7 R55-9, 1995, Scholten, R J P M , Bijlmer, H A , Poolman, J T et al Clin Infect Dis 16 237-246, 1993, Cruz C , Pávez, G , Aguilar, E , et al , Epidemiol Infect 105 119-126, 1990). Las incidencias especificas de edad en los dos grupos de alto riesgo, infantes y
20 adolescentes, alcanzan niveles mayores

 Las epidemias dominadas por el serogrupo A de meningococos aparecen principalmente en Africa central, alcanzando niveles hasta de 1000/100 000/año (Schwartz, B , Moore, P S Broome, C V Clin Microbiol Rev 2 (suplemento), paginas 18-24, 1989)
25 Casi todos los casos de enfermedad meningococcica en conjunto estan causados por los serogrupos A, B, C, W-135 e Y de meningococos. Esta disponible una vacuna de polisacaridos capsulares tetravalente A, C, W-135, Y (Armand, J , Arminjon, F , Mynard, M C , Lafaix, C , J Biol Stand 10 335-339, 1982)

Las vacunas de polisacáridos se estan mejorando actualmente por medio de la conjugacion quimica con proteinas vehiculo (Lieberman, J M , Chiu, S S , Wong, V K , et al , JAMA 275 1499-1503, 1996) No está disponible una vacuna del serogrupo B porque el polisacárido capsular B es no inmunogenico, probablemente porque comparte similitud estructural con componentes del huésped (Wyles F A , Artenstein, M S , Brandt M L et al , J Infect Dis 126 514-522, 1972, Finne, J M , Leinonen, M Mäkelä, P M Lancet ii 355-357, 1983)

Durante muchos años se han enfocado los esfuerzos sobre el desarrollo de vacunas basadas en membrana externa meningocócica (de Moraes, J C , Perkins, B , Camargo, M C et al , Lancet 340 1074-1078, 1992, Bjune, G , Hoiby, E A , Gronnesby, J K , et al 338 1093-1096, 1991) Dichas vacunas han demostrado eficacias de 57-85% en niños mayores (>4 años) y adolescentes La mayoría de estos ensayos de eficacia se realizaron con vacunas VME (vesículas de membrana externa, derivadas por reducción de LPS de las ampollas) derivadas de cepas de tipo silvestre de *N meningitidis*

Muchos componente de membrana externa bacteriana están presentes en estas vacunas, como PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa y FrpB, y la contribución de estos componentes a la protección observada necesita mas definición Se han definido otros componentes de membrana externa bacteriana (utilizando anticuerpos animales o humanos) como potencialmente relevantes para la inducción de inmunidad protectora, como TbpB, NspA (Martin, D , Cadieux, N , Hamel, J , Brodeux, B R , J Exp Med 185 1173-1183, 1997), Lissolo, L , Maître-Wilmotte, C , Dumas, P et al , Inf Immun 63 884-890, 1995) El mecanismo de

inmunidad protectora implicara actividad bactericida mediada y opsonofagocitosis mediadas por anticuerpo

La frecuencia de las infecciones de *Neisseria meningitidis* ha aumentado drásticamente en las pasadas décadas. Esto se ha atribuido a la emergencia de cepas resistentes a múltiples antibióticos, y a una exposición aumentada debida a un aumento de las actividades sociales (por ejemplo piscinas o teatros). Ya no es infrecuente aislar cepas de *Neisseria meningitidis* que son resistentes a algunos o a todos los antibióticos estandares. Este fenomeno ha creado una necesidad medica sin satisfacer y una demanda de nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de rastreo de medicamentos y ensayos de diagnóstico para este organismo.

Moraxella catarrhalis

Moraxella catarrhalis (también llamada *Branhamella catarrhalis*) es una bacteria Gram negativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. Es responsable de graves patologias, siendo las principales otitis media en infantes y niños, y neumonia en los mayores. También es responsable de sinusitis, infecciones nosocomiales y, menos frecuentemente, enfermedades invasivas.

Se han identificado anticuerpos bactericidas en la mayoría de los adultos ensayados (Chapman, A J et al (1985) J Infect Dis 151 878). Las cepas de *M. catarrhalis* presentan variaciones en su capacidad de resistir la actividad bactericida del suero en general los aislados de individuos enfermos son mas resistentes que los que estan simplemente colonizados (Hol, C et al (1993) Lancet 341 1281, Jordan K L et al , (1990) Am J

12
Med 88 (supl 5A) pag 28) La resistencia al suero podría ser considerada por lo tanto como un factor de virulencia de la bacteria. Se ha observado una actividad opsonizante en los sueros de niños que se recuperaban de otitis media.

5 No se han identificado los antígenos a los que se dirigen estas distintas respuestas inmune en humanos, con la excepción de OMP B1, una proteína de 84 kDa, la expresión de la cual está regulada por hierro, y que es reconocida por los sueros de pacientes con neumonía (Sethi, S et al (1995) Infect Immun
10 63 1516) y de UspA1 y UspA2 (Chen, D et al (1999), Infect Immun 67 1310)

Se han caracterizado unas pocas proteínas de membrana más sobre la superficie de *M. catarrhalis* utilizando procedimientos bioquímicos por su potencial implicación en la inducción de una
15 inmunidad protectora (como revisión vease Murphy, T F (1996) Microbiol Rev 60 267). En un modelo de neumonía en ratón, la presencia de anticuerpos creados frente a algunos de ellos (UspA, CopB) favorece una descongestión más rápida de la infección pulmonar. Otro polipéptido (OMP CD) está altamente
20 conservado entre las cepas de *M. catarrhalis* y presenta homología con una porina de *Pseudomonas aeruginosa*, que se ha demostrado que es eficaz contra esta bacteria en modelos animales.

M. catarrhalis produce vesículas de membrana externa
25 (ampollas). Estas ampollas se han aislado o extraído utilizando diferentes procedimientos (Murphy, T F, Loeb, M R, 1989, Microb Pathog 6 159-174, Unhanahand, M, Maciver, I, Ramillo, O, Arencibia-Mireles, O, Argyle J C, MacCracken G H Jr, Hansen, E J, 1992, J Infect Dis 165 644-650). La capacidad

13

protectora de dichas preparaciones de ampollas se ha ensayado en un modelo de murina para la descongestión pulmonar de *M catarrhalis*. Se ha mostrado que la inmunización activa con vacuna de ampollas o la transferencia pasiva de anticuerpos anti-ampollas inducen una protección significativa en este modelo (Maciver, I, Unahanand, M, McCracken, G H Jr, Hansen, E J, 1993, J Infect Dis 168 469-472)

Haemophilus influenzae

10 *Haemophilus influenzae* es una bacteria Gram negativa no móvil. El hombre es su único huésped natural. Los aislados de *H influenzae* se clasifican habitualmente según su cápsula de polisacárido. Se han identificado seis tipos capsulares diferentes designados de "a" a "f". Los aislados que no
15 consiguen aglutinarse con los antisueros creados contra uno de estos seis serotipos se clasifican como no tipificables, y no expresan una capsula.

El tipo b (Hib) de *H influenzae* es claramente diferente de los demás tipos en que es la causa mayoritaria de meningitis bacteriana y enfermedades sistémicas. Las cepas no tipificables de *H influenzae* (NTH1) se aíslan sólo ocasionalmente de la sangre de pacientes con enfermedad sistémica. NTH1 es una causa común de neumonía, exacerbación de bronquitis crónica, sinusitis y otitis media. Las cepas NTH1 demuestran una gran variabilidad
20 identificadas por análisis clonal, mientras que las cepas Hib como conjunto son más homogéneas.

Se ha mostrado que diversas proteínas de *H influenzae* están implicadas en la patogénesis o se ha mostrado que confieren protección por vacunación en modelos animales.

Se ha informado de adherencia de NTH1 a células epiteliales nasofaríngeas humanas (Read, R C , et al 1991, J Infect Dis 163 549) Aparte de en ribetes y pelos (Brinton, C C , et al , 1989, Pediatr Infect Dis J 8 página 54, Kar, S et al 1990, 5 Infect Immun 58 903, Gildorf, J R et al , 1992, Infect Immun 60 374, St Geme, J W et al 1991 Infect Immun 59 3366, St Geme, J W et al, 1993 Infect Immun 61 2233), se han identificado muchas adhesinas en NTH1 Entre ellas, dos proteínas de alto peso molecular expuestas a la superficie, 10 designadas como HMW1 y HMW2, se ha mostrado que median la adhesión de NTH1 a las células epiteliales (St Geme, J W , et al , 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90 2875) Se ha identificado otra familia de proteínas de alto peso molecular en las cepas NTH1 exentas de proteínas que pertenezcan a la familia 15 HMW1/HMW2 La proteína H1a de 115 kDa de NTH1 (Barenkamp, S J , St Geme, S W , 1996, Mol Microbiol en prensa) es muy similar a la adhesina Hsf expresada por cepas de tipo b de *H influenzae* (St Geme, J W , et al 1996, J Bact 178 6281) Otra proteína, la proteína Hap, muestra similitud con las serinproteasas IgA1 y 20 se ha mostrado que esta implicada en tanto la adhesión como la entrada en la célula (St Geme, J W et al , 1994, Mol Microbiol 14 217)

Se han identificado cinco proteínas mayoritarias de membrana externa (OMP) y se han numerado consecutivamente Los 25 estudios originales que utilizaban cepas tipo b de *H influenzae* mostraron que los anticuerpos específicos de las OMP P1 y P2 protegían a infantes de rata de la consiguiente infección (Loeb, M R et al 1987 Infect Immun , 55 2612, Musson, R S Jr et al , 1983, J Clin Invest 72 677) Se encontró que P2 era

capaz de inducir anticuerpos bactericidas y opsonicos que se dirigen contra las regiones variables presentes en las estructuras de bucle expuestas a la superficie de esta OMP integral (Haase, E M et al , 1994, Infect Immun 62 3712, Troesltra A et al 1994, Infect Immun 62 779) La lipoproteina P4 puede inducir tambien anticuerpos bactericidas (Green, B A , et al , 1991, Infec Immun 59 3191)

La OMP P6 es una lipoproteina asociada a peptidoglicano conservada que compone el 1-5% de la membrana externa (Nelson, M B et al , 1991, Infect Immun 59 2658) Despues se reconoció una lipoproteina de alrededor del mismo peso molecular llamada PCP (proteina de reaccion cruzada P6) (Deich, R M et al 1990, Infect Immun 58 3388) Una mezcla de las lipoproteinas conservadas P4, P6 y PCP no reveló protección al medir en un modelo de otitis media en chinchilla (Green, B A et al , 1993, Infect Immun 61 1950) P6 sola parece inducir la proteccion en el modelo de chinchilla (Demaria, T F et al , 1996, Infect Immun 64 5187)

Se ha descrito tambien una proteina de fimbrina (Miyamoto, N , Bakaletz, L O 1996, Microb Pathog 21 343) con homologia con la OMP P5, que tiene homologia de secuencia a su vez con la OmpA integral de *Escherichia coli* (Miyamoto, N , Bakaletz, L O 1996, Microb Pathog 21 343, Munson, R S Jr et al , 1993, Infect Immun 61 1017) NTH1 parece adherirse a la mucosidad por medio de los ribetes

En la linea de las observaciones realizadas con gonococos y meningococos, NTH1 expresa un receptor de transferrina humana dual compuesto por TbpA y TbpB al hacerse crecer con limitación de hierro El anticuerpo anti-TbpB protegió a infantes de rata

(Loosmore, S M et al , 1996, Mol Microbiol 19 575) También se ha descrito el receptor de hemoglobina/haptoglobina para NTH₁ (Maciver, I et al , 1996, Infect Immun 64 3703) Se ha identificado también un receptor de Haem hemopexina (Cope, L D et al 1994, Mol Microbiol 13 868) También esta presente un receptor de lactoferrina entre los NTH₁, pero todavía no esta caracterizado (Schryvers, A B et al 1989 J Med Microbiol 29 121) No se ha descrito una proteína similar a la proteína Frp-B neiserica entre los NTH₁

10 Una OMP de 80 kDa, el antígeno de superficie D15, proporciona protección frente a NTH₁ en un modelo de ensayo en ratón (Flack, F S et al , 1995, Gene 156 97) Se conserva una lipoproteína de membrana externa de 42 kDa, LPD, en *Haemophilus influenzae* e induce anticuerpos bactericidas (Akkoyunlu, M et al 1996 Infect Immunol 64 4586) Se encontro que una OMP menor de 98 kDa (Kimura, A et al, 1985, Infect Immun 47 253) era un antígeno protector, esta OMP puede muy bien ser una de las OMP inducibles por limitacion de Fe o adhesinas de alto peso molecular que se han caracterizado mas tarde *H influenzae* produce actividad IgA1 proteasa (Mulks, M H , Shoberg, R J 20 1994, Meth Enzymol 235 543) Las proteasas de IgA1 de NTH₁ tienen un alto grado de variabilidad antigenica (Lomholt, H , van Alphen, L , Killian, M , 1993, Infect Immun 61 4575)

Otra OMP de NTH₁, OMP26, una proteína de 26 kDa, se ha 25 mostrado que mejora la descongestión pulmonar en un modelo de rata (Kyd, J M , Cripps, A W 1998, Infect Immun 66 2272) La proteína HtrA de NTH₁ tambien ha mostrado ser un antígeno protector Ciertamente, esta proteína protegía a la chinchilla frente a otitis media y protegía a infantes de rata frente a

11

bacteremia de tipo b de *H influenzae* (Loodmore, S M et al , 1998, Infect Immun 66 899)

Se han aislado vesículas de membrana externa (o ampollas) de *H influenzae* (Loeb, M R , Zachary, A L Smith, D H , 1981, J Bacteriol 145 569-604, Stull, T L , Mack, K , Haas J E , Smit, J , Smith, A L , 1985, Anal Biochem 150 471-480) Las vesículas se han asociado con la inducción de la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro (Wiwipelwey, B , Hansen, E J , Scheld, W M , 1989, Infec Immun 57 2559-2560), la inducción de inflamación meningococcica (Mustafa, M M , Ramilo, O , Syrogiannopoulos, G A , Olsen, K D , McCracken G H Jr , Hansen, E J , 1989, J Infect Dis 159 917-922) e incorporación de DNA (Concino, M F , Goodgal S H , 1982, J Bacteriol 152 441-450) Estas vesículas son capaces de unirse y ser absorbidas por el epitelio mucoso nasal (Harada, T , Shimuzu, T , Nishimoto, K , Sakakura, Y , 1989, Acta Otorhinolarygol 246 218-221) mostrando que adhesinas y/o factores de colonización podrían estar presentes en las ampollas Se ha observado respuesta inmune a las proteínas presentes en las vesículas de membrana externa en pacientes con diversas enfermedades de *H influenzae* (Sakakura, Y , Harada, T , Hamaguchi, Y , Jin, C S , 1988, Acta Otorhinolaygol Supl (Estocol) 454 222-226, Harada, T , Sakakura, Y , Miyoshi, Y , 1986, Rhinology 24 61-66)

25 *Pseudomonas aeruginosa*

El genero *Pseudomonas* esta constituido por bastones rectos y ligeramente curvos con flagelos polares Gram negativos que crecen aerobicamente y no forman esporas Debido a sus limitados requerimientos metabólicos, *Pseudomonas spp* son ubicuas y estan

ampliamente distribuidas en el suelo, el aire, las aguas residuales y en plantas. Se ha mostrado que numerosas especies de *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*, *P. pseudomallei*, *P. mallei*, *P. maltophilia* y *P. cepacia*, son también patógenas para humanos.

Entre esta lista, *P. aeruginosa* se considera como un importante patógeno humano, ya que está asociado con infecciones oportunistas de huéspedes inmunocomprometidos y es responsable de la alta morbilidad de los pacientes hospitalizados. La infección nosocomial con *P. aeruginosa* afecta principalmente a pacientes sometidos a un tratamiento prolongado y que reciben agentes inmunosupresores, corticosteroides, antibióticos, antimetabolitos o radiación.

Las *Pseudomonas*, y particularmente *P. aeruginosa*, producen una serie de toxinas (como hemolisinas, fibrinolisin, esterases, coagulasas, fosfolipasas, endo y exotoxinas) que contribuyen a la patogenicidad de estas bacterias. Además, estos organismos tienen una resistencia intrínseca a los antibióticos debido a la presencia de múltiples bombas de salida de medicamento. Esta última característica complica a menudo el desenlace de la enfermedad.

Debido al uso incontrolado de agentes quimioterapéuticos antibacterianos, la frecuencia de la infección nosocomial causada por *P. aeruginosa* ha aumentado considerablemente durante los últimos 30 años. En los Estados Unidos, por ejemplo, la carga económica de la infección nosocomial por *P. aeruginosa* se estima en 4 500 millones de dólares estadounidenses al año. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna para inmunización activa o pasiva frente a *P. aeruginosa* es energicamente necesitada (como revisión vease Stanislavsky et al, 1997, FEMS Microbiol Lett ,

21 243-277)

Diversos antígenos asociados a célula y segregados por *P. aeruginosa* han sido sujeto de desarrollo de vacunas. Entre los antígenos de *Pseudomonas*, se encontró que la sustancia mucóide, que es un limo extracelular constituido predominantemente por alginato, era heterogénea en términos de tamaño e inmunogenicidad. Los componentes de alginato de alto peso molecular (30-300 kDa) parecen contener epítomos conservados, mientras que los componentes de alginato de bajo peso molecular (10-30 kDa) poseen epítomos conservados además de epítomos únicos. Entre las proteínas asociadas de superficie, se ha mostrado que PcrV, que es parte del aparato de secreción-translocación de tipo III, es un objetivo interesante para la vacunación (Sawa et al., 1999, Nature Medicine, 5: 392-398).

Los antígenos expuestos a la superficie, incluyendo los O-antígenos (polisacáridos O-específicos de LPS) o antígenos H (antígenos flagelares) se han utilizado para serotipar debido a su naturaleza altamente inmunogénica. Las estructuras químicas de las unidades repetidas de polisacáridos O-específicos se han elucidado y estos datos permiten la identificación de 31 quimiotipos de *P. aeruginosa*. Los epítomos conservados entre todos los serotipos de *P. aeruginosa* están localizados en el oligosacárido núcleo y en la región lípido A de LPS y los inmunógenos que contienen estos epítomos inducen inmunidad protectora cruzada en ratones frente a diferentes inmunotipos de *P. aeruginosa*. El núcleo externo de LPS se implicó como un ligando de unión de *P. aeruginosa* a las células epiteliales aéreas y oculares de animales. Sin embargo, existe heterogeneidad en esta región externa del núcleo entre los

20

distintos serotipos Los epitopos del nucleo interno estan altamente conservados y se ha demostrado que son accesibles en superficie, y no estan enmascarados por polisacaridos O-especificos

5 Para examinar las propiedades protectoras de las proteinas de ME, se utilizo una vacuna que contenia proteinas de ME de *P aeruginosa* de masas moleculares de 20 a 100 kDa en ensayos clinicos y preclinicos Esta vacuna fue eficaz en modelos animales frente a ensayo con *P aeruginosa* e indujo altos
10 niveles de anticuerpos especificos en voluntarios humanos El plasma de voluntarios humanos que contenia anticuerpos anti-*P aeruginosa* proporciono proteccion pasiva y ayudo a la recuperacion del 87% de los pacientes con formas graves de infeccion por *P aeruginosa* Mas recientemente, se mostro que
15 una proteina hibrida que contenia partes de las proteinas de membrana externa OprF (aminoacidos 190-342) y OprI (aminoacidos 21-83) de *Pseudomonas aeruginosa* fusionada con la glutathion-S-transferasa, protegia a ratones frente a una dosis letal al 50% multiplicada por 975 de *P aeruginosa* (Knapp et al , 1999,
20 Vaccine, 17 1663-1669)

Los presentes inventores han reconocido una serie de inconvenientes asociados con las vacunas de ampollas de tipo silvestre anteriores (de origen natural o preparadas
25 quimicamente)

Ejemplos de dichos problemas son los siguientes

- la presencia de proteinas inmunodominantes pero variables en la ampolla (PorA, TbpB, Opa [*N meningitidis* B], P2, P5 [*H influenzae* no

21

tipificable], siendo efectivas dichas ampollas sólo frente a una selección restringida de especies bacterianas. La especificidad de tipo de la respuesta de anticuerpo bactericida puede imposibilitar el uso de dichas vacunas en la infancia

- La presencia de antígenos no protectores (no relevantes) (Rmp, H8,) en la ampolla, antígenos que son señuelos para el sistema inmune
- La ausencia de moléculas importantes que se producen condicionalmente (por ejemplo proteínas de membrana externa reguladas por hierro), dichas condiciones son difíciles de controlar en la producción de ampollas para optimizar la cantidad de antígeno en la superficie
- El bajo nivel de expresión de antígenos protectores (particularmente conservados) (NspA, p6)
- La toxicidad del LPS restante en la superficie de la ampolla
- La inducción potencial de una respuesta inmune debido a estructuras idénticas al huésped (por ejemplo el polisacárido capsular en el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, la lacto-N-neotetraosa en el LPS de *Neisseria*, la estructura sacárida en el LPS de NTH1, estructuras sacáridas con pelos)

Dichos problemas pueden evitar el uso de vacunas de ampollas como reactivos de vacuna humanos. Este es particularmente el caso para uso pediátrico (<4 años), en el que la reactogenicidad frente a vacunas de ampollas es

22

particularmente importante, y en el que las vacunas de ampollas (por ejemplo la vacuna de ampollas comercializada, MenB, mencionada anteriormente) han mostrado que son ineficaces como inmunoprotectoras. Consiguientemente, la presente invención proporciona procedimientos para aliviar los problemas anteriores utilizando cepas bacterianas genéticamente modificadas, que dan como resultado vacunas de ampollas mejoradas. Dichos procedimientos serán especialmente útiles en la generación de nuevas vacunas frente a patógenos bacterianos como *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y otros.

Las vacunas de ampollas de la invención se diseñan para enfocar la respuesta inmune en unos pocos antígenos o epítomos protectores (preferiblemente conservados), formulados en una vacuna de múltiples componentes. Cuando dichos antígenos son OMP integrales, las vesículas de membrana externa de las vacunas de ampollas asegurarán su adecuado plegamiento. Esta invención proporciona procedimientos para optimizar la composición de OMP y LPS de las vacunas (VME (de ampollas)) mediante supresión de la variable inmunodominante, así como de las OMP no protectoras, creación de OMP conservadas por supresión de las regiones variables, por sobrerregulación de las OMP protectoras y por eliminación de los mecanismos de control de la expresión (como la restricción de hierro) de las OMP protectoras. Además, la invención proporciona la reducción de la toxicidad del lípido A por modificación de la parte lipídica o por cambio de la composición de fosfolípidos reteniendo su actividad coadyuvante, o por enmascaramiento. Cada uno de estos nuevos procedimientos de mejora, mejora individualmente la vacuna de ampollas, sin

embargo una combinación de uno o más de estos procedimientos actua conjuntamente para producir una vacuna de ampollas modificada optimizada que es inmunoprotectora y no toxica, particularmente adecuada para uso pediátrico

5

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invencion proporciona una preparacion de ampollas geneticamente modificadas a partir de una cepa bacteriana Gram negativa, caracterizada porque la citada preparaci3n es obtenible empleando uno o mas procedimientos seleccionados del siguiente grupo

a) Un procedimiento de reduccion de antigenos variables inmunodominantes o no protectores en la preparacion de las ampollas, que comprende las etapas de determinacion de la identidad de dicho antigeno, modificacion de una cepa bacteriana para producir menos o nada del citado antigeno y preparaci3n de ampollas de la citada cepa,

b) un procedimiento de sobrerregulaci3n de la expresion de antigenos de OMP endogenos protectores (y preferiblemente conservados) en la preparaci3n de la ampolla, que comprende las etapas de identificacion de dicho antigeno, modifiacci3n de una cepa bacteriana para introducir una secuencia promotora mas fuerte cadena arriba de un gen que codifica dicho antigeno, de manera que el citado gen se exprese a un nivel superior al de la ampolla no modificada, y preparaci3n de ampollas de la citada cepa,

c) un procedimiento de sobrerregulaci3n de la expresion

24

de antígenos de OMP protectores condicionalmente expresados (y preferiblemente conservados) en la preparacion de la ampolla, que comprende las etapas de identificación de dicho antígeno, modificacion de una cepa bacteriana para eliminar los mecanismos de control represivo de su expresion (como la restricción de hierro), y preparacion de ampollas de la citada cepa,

d) un procedimiento de modificacion de la parte lipido A del LPS bacteriano en la preparación de la ampolla, que comprende las etapas de identificación del gen implicado en la transformacion en toxica de la parte lipido A de LPS, modificacion de una cepa bacteriana para reducir o desactivar la expresión del citado gen, y preparacion de ampollas de la citada cepa,

e) un procedimiento de modificacion de la parte lipido A del LPS bacteriano en la preparacion de la ampolla, que comprende las etapas de identificacion del gen implicado en la transformacion en menos toxica de la parte lipido A de LPS, modificacion de una cepa bacteriana para introducir una secuencia promotora mas fuerte cadena arriba del citado gen, de modo que el citado gen se exprese a un nivel superior al de la ampolla no modificada, y preparacion de ampollas de la citada cepa,

f) un procedimiento de reduccion de la toxicidad del lipido A en la preparacion de la ampolla y aumento de los niveles de antígenos protectores, que comprende las etapas de modificación del cromosoma de una cepa

bacteriana para incorporar un gen que codifica un peptido polimixina A, o un derivado o análogo de este, condensado a un antígeno protector, y preparacion de ampollas de la citada cepa,

- 5 g) un proceso de creación de antígenos de OMP conservados en la preparacion de la ampolla, que comprende las etapas de identificación de dicho antígeno, modificacion de una cepa bacteriana para suprimir las regiones variables de un gen que codifica dicho
- 10 antígeno, y preparación de ampollas de la citada cepa,
- h) un procedimiento de reducción, en la preparacion de la ampolla, de la expresion de un antígeno que comparte similitud estructural con una estructura humana y puede ser capaz de inducir una respuesta inmune en
- 15 humanos (como el polisacárido capsular de *N meningitidis* B), que comprende las etapas de identificación del gen implicado en la biosíntesis del antígeno, modificación de una cepa bacteriana para reducir o eliminar la desactivar la expresion del
- 20 citado gen, y preparacion de ampollas de la citada cepa,
- i) un procedimiento de sobrerregulacion de la expresion de antígenos de OMP endogenos protectores (y preferiblemente conservados) en la preparacion de la
- 25 ampolla, que comprende las etapas de identificación del citado antígeno, modificacion de una cepa bacteriana para introducir en el cromosoma una o mas copias de un gen que codifique el citado antígeno controlado por una secuencia promotora heterologa más

fuerte, y preparacion de ampollas de la citada cepa

Otros aspectos de la invencion incluyen los procedimientos preferidos para obtener la preparacion de ampollas anterior, incluyendo el posicionamiento optimo de los promotores fuertes para la sobrerregulación y subrregulación de diversas cepas bacterianas para obtener preparaciones de ampollas particularmente adecuadas para uso de vacunas. Se proporcionan tambien las formulaciones preferidas que comprenden las ampollas de la invención que son particularmente adecuadas para vacunas globales frente a ciertos estados de enfermedad. Los vectores para producir las ampollas de la invención, y las cepas bacterianas modificadas a partir de las cuales se producen las ampollas de la invención, son también aspectos de la invencion.

La presente invencion proporciona por primera vez una vacuna de ampollas que es inmunoprotectora y no toxica utilizada con niños menores de 4 años de edad.

BREVE DESCRIPCION DE LAS ILUSTRACIONES

20

Figura 1 Reactividad de mAb 735 en diferentes colonias

Figura 2 Reactividades de anticuerpos monoclonales especificos por ELISA de células enteras

25

Figura 3 Representacion esquematica de los vectores pCMK utilizados para introducir genes, operones y/o modulos de expresion en el genoma de *Neisseria meningitidis*

27

Figura 4 Análisis de la expresión de PorA en extractos de proteína total del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* recombinante (derivados H44/76) Se recuperaron las proteínas totales de las cepas cps- (calles 3 y 4), cps- porA pCMK+ (calles 2 y 5), y cps- porA nspA (calles 1 y 6) de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* recombinante y se analizaron en condiciones PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 12% Se tiñeron los geles con azul de Coomassie (calles 1 a 3) o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunotiñeron con anticuerpo monoclonal anti-PorA

Figura 5 Análisis de la expresión de NspA en extractos de proteína de cepas del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* recombinante (derivados H44/76) Se extrajeron las proteínas de bacterias- enteras (calles 1 a 3) o de preparaciones de ampollas de membrana externa (calles 4 a 6) separadas por PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 12% y se analizaron por inmunotransferencia utilizando el suero policlonal anti-NspA Se analizaron las muestras correspondientes a cps- (calles 1 y 6), cps-, porA pCMK+ (calles 3 y 4) y cps- porA nspA (calles 2 y 5) Se detectaron dos formas de NspA una forma madura (18 kDa) que migraba conjuntamente con el NspA purificado, y un forma mas corta (15 kDa)

Figura 6 Análisis de la expresion de D15/omp85 en extractos de proteína de cepas del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* recombinante (derivados H44/76) Se extrajeron las proteínas de preparaciones de ampollas de membrana externa y se separarpn por PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 12% y se analizaron por

Handwritten mark: a stylized 'S' or '7' with a vertical line through it.

inmunotransferencia utilizando un suero policlonal anti-omp85 Se analizaron las muestras correspondientes a las cepas del serogrupo B de *N. neisseria* recombinante, cps- (calle 2) y cps- PorA+, pCMK+ omp85/D5 (calle 1)

5

Figura 7 Estrategia general para la modulación de la expresión de genes por introducción de promotor (RS simboliza sitio de restricción)

10 **Figura 8** Análisis de las ampollas de membrana externa producidas por las cepas cps- del serogrupo B de *N. meningitidis* recombinante (derivados H44/76) Se extrajeron las proteínas de las preparaciones de ampollas de membrana externa y se separaron por PAGE-SDS en condiciones reductoras en gel de poliacrilamida
15 de gradiente 4-20% El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R250 Las calles 2, 4, 6 correspondían a 5 µg de proteínas totales, mientras que las calles 3, 5 y 7 se cargaron con 10 µg de proteína

20 **Figura 9** Construcción de un plasmido de reemplazamiento de promotor utilizado para sobrerregular la expresión/producción de Omp85/D15 en H44/76 de *Neisseria meningitidis*

Figura 10 Análisis de la expresión de OMP85 en los extractos de
25 proteína total de NmB recombinante (derivados H44/76) Se tiñeron los geles con azul de Coomassie (A) o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunotiñeron con anticuerpo monoclonal (B) de conejo anti-OMP85 (*N. gono*)

Figura 11 Análisis de la expresión de OMP85 en preparaciones de VME de NmB recombinante (derivados H44/76) Se tiñeron los geles con azul de Coomassie (A) o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunotiñeron con anticuerpo monoclonal (B) de conejo anti-OMP85

Figura 12 Representación esquemática de la estrategia de PCR recombinante utilizada para suprimir el *lacO* en el promotor quimerico *porA/lacO*

Figura 13 Análisis de la expresión de Hsf en los extractos de proteína total del serogrupo B de *N meningitidis* recombinante (derivados H44/76) Se recuperaron las proteínas totales de las cepas Cps-PorA+ (calles 1) y Cps-Por+/Hsf (calles 2) del serogrupo B de *N meningitidis* recombinante y se analizaron en condiciones PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 12% Los geles se tiñeron con azul de Coomassie

Figura 14 Análisis de la expresión de GFP en los extractos de proteína total de *N meningitidis* recombinante (derivados H44/76) Se recuperaron las proteínas totales de las cepas Cps-, PorA+ (calles 1), Cps-PorA-GFP+ (calles 2 y 3) Las proteínas se separaron por PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 12% y después se tiñeron con azul de Coomassie

Figura 15 Ilustración del patrón de las proteínas mayoritarias sobre la superficie de diversas preparaciones de ampollas recombinantes analizadas por PAGE-SDS (tinción de Coomassie)

70

Figura 16 Respuesta específica anti-Hsf para diversas preparaciones de ampollas y ampollas recombinantes utilizando proteína Hsf recombinante

5

Figura 17 Analisis de la expresion de NspA en extractos de proteina total de NmB recombinante (derivados del serogrupo B) Se tiñeron los geles con azul de Coomassie (A) o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunotiñeron con anticuerpo monoclonal de raton anti-PorA (B) o anticuerpo policlonal de raton anti-NspA (C)

10

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invencion se refiere a un conjunto ~~general~~ de herramientas y procedimientos capaces de utilizarse para fabricar ampollas mejoradas modificadas genéticamente de cepas bacterianas Gram negativas La invencion incluye los procedimientos utilizados para hacer las ampollas recombinantes, mas inmunogénicas, menos toxicas y más seguras para su uso en vacunas humanas y/o animales Ademas, la presente invencion describe tambien los procedimientos específicos necesarios para fabricar, producir, obtener y utilizar las ampollas recombinantes modificadas de diversas bacterias Gram negativas para vacunas, fines terapeuticos y/o de diagnóstico Mediante los procedimientos de la invención puede manipularse la composicion bioquimica de las ampollas bacterianas actuando sobre/alterando la expresión de los genes bacterianos que codifican los productos presentes en o asociados con las ampollas de membrana externa (proteinas de membrana externa u

15

20

25

27

OMP) La produccion de ampollas utilizando un procedimiento de modificacion genetica para aumentar, reducir o hacer condicional la expresion de uno o mas genes que codifican los componentes de membrana externa esta también incluida en el alcance de esta invencion

Para clarificar, el termino "modulo de expresión" se referira en la presente a todos los elementos genéticos necesarios para expresar un gen o un operon y para producir y dirigir la(s) correspondiente(s) proteina(s) de interés a las ampollas de membrana externa, derivados de un huesped bacteriano dado Una lista no exhaustiva de estas características incluye los elementos de control (transcripcional y/o de traducción), las regiones de codificacion de proteinas y señales de direccionamiento, con un espaciado adecuado entre ellos La referencia a la insercion de una secuencia promotora significa, con los fines de esta invención, la inserción de una secuencia con al menos una funcion promotora, y preferiblemente uno o mas elementos regulatorios geneticos comprendidos en un modulo de expresion Ademās, el termino "módulo integrativo" se referirá en la presente a todos los elementos geneticos requeridos para integrar un segmento de DNA en un huesped bacteriano dado Una lista no exhaustiva de estas características incluye un vehiculo de suministro (o vector) con regiones recombinantes y marcadores antiselectivos y selectivos

Nuevamente con el propósito de clarificar, los términos "modificacion de una cepa bacteriana para producir menos cantidad del mencionado antígeno" se refiere a cualquier medio para reducir la expresion de un antígeno de interés, en relacion a la ampolla no modificada (es decir, la producida de forma

32

natural) tal que la expresión es al menos un 10% menor que la ampolla no modificada Preferiblemente es al menos un 50% menor La "secuencia promotora mas fuerte" se refiere a un elemento de control regulatorio que incrementa la transcripción para un gen
5 que que codifica el antígeno de interés La "expresión de sobrerregulación" se refiere a cualquier medio para mejorar la expresión de un antígeno de interés, en relación a la ampolla no modificada (es decir, producida de forma natural) Se puede entender que la cantidad de "sobrerregulación" variará
10 dependiendo del antígeno particular de interés pero no excedera de una cantidad que rompa la integridad de la membrana de la ampolla La sobrerregulación de un antígeno se refiere a la expresión que es al menos un 10% superior que la de la ampolla no modificada Preferiblemente es al menos un 50% mayor Mas
15 preferiblemente es al menos un 100% (2 veces) mayor

Aspectos de la invención se refieren a los procedimientos ~
individuales de preparación de las ampollas modificadas [a una {
combinación de dichos procedimientos y las [composiciones de }
ampollas preparadas como resultados de estos procedimientos ;
20 Otro aspecto de la invención se refiere a las herramientas genéticas utilizadas para modificar genéticamente una cepa bacteriana elegida para extraer las ampollas modificadas mejoradas de la citada cepa

Las etapas de modificación de los procedimientos de la
25 invención pueden llevarse a cabo en una variedad de formas
conocidas por el experto Por ejemplo, pueden insertarse las secuencias (por ejemplo promotores o marcos de lectura abiertos) y pueden desestabilizarse los promotores/genes por la técnica de inserción de transposones Por ejemplo, para sobrerregular la

7

expresión de un gen, podría insertarse un promotor fuerte a través de un transposon hasta 2 kB cadena arriba del codon de iniciación del gen (mas preferiblemente 200-600 pb cadena arriba, lo mas preferido aproximadamente 400 pb cadena arriba)

5 Puede utilizarse tambien la mutación puntual o supresión (particularmente para la expresión subregulada de un gen)

Dichos procedimientos, sin embargo, pueden ser muy inestables o inciertos, y por lo tanto se prefiere que la etapa de modificación [particularmente para los procedimientos a), b),
10 c), d), e), h) e i) como se describen a continuación] se realice a través de un suceso de recombinación homólogo. Preferiblemente, el suceso tiene lugar entre una secuencia (una región recombinogénica) de al menos 30 nucleótidos en el cromosoma bacteriano y una secuencia (una segunda secuencia
15 recombinogénica) de al menos 30 nucleótidos en un vector transformado en la cepa. Preferiblemente, las regiones son de 40-100 nucleótidos, mas preferiblemente de 100-800 nucleótidos, lo mas preferido es de 500 nucleótidos. Estas regiones recombinogénicas deberían ser suficientemente similares como
20 para que sean capaces de hibridarse una con otra en condiciones muy estrictas (como se definen después)

Los sucesos de recombinación pueden tener lugar utilizando una región recombinogénica simple en el cromosoma y vector, o a través de un suceso de doble cruzamiento (con 2 regiones del
25 cromosoma y vector). Para realizar un suceso de recombinación simple, el vector debería ser una molécula de DNA circular. Para realizar un suceso de doble recombinación, el vector debería ser una molécula de DNA circular o lineal (vease la Figura 7). Es preferible emplear un suceso de doble recombinación y que el

32

vector utilizado sea lineal, ya que la bacteria modificada así
producida será más estable en términos de sucesos de reversión.
Preferiblemente, las dos regiones recombinogénicas del cromosoma
(y del vector) son de longitud similar (lo más preferido es que
5 sea la misma), de modo que se estimulen dobles cruzamientos. El
doble cruzamiento funciona de manera que las dos regiones
recombinogénicas del cromosoma (separadas por una secuencia de
nucleótidos "X") y las dos regiones recombinogénicas del vector
(separadas por una secuencia de nucleótidos "Y") se recombinan
10 dejando un cromosoma inalterado excepto porque X e Y se han
intercambiado. La posición de las regiones recombinogénicas
puede ser tanto posicionadas cadena arriba como cadena abajo o
pueden estar adyacentes a un marco abierto de lectura de
interés. Estas regiones pueden estar constituidas por secuencias
15 de codificación, de no codificación o una mezcla de codificación
y no codificación. La identidad de X e Y dependerá del efecto
deseado, X puede ser todo o en parte un marco de lectura abierto
e Y ningún nucleótido, lo que daría como resultado la supresión
de la secuencia X del cromosoma. Como alternativa, Y puede ser
20 una región promotora fuerte para la inserción cadena arriba de
un marco de lectura abierto, y por lo tanto X puede ser ningún
nucleótido.

Los vectores adecuados variarán en composición dependiendo
del tipo de suceso de recombinación que se realice, y de cuál
25 sea el fin último del suceso de recombinación. Los vectores
integrativos utilizados para insertar la región Y pueden ser
condicionalmente replicativos o plásmidos suicidas,
bacteriófagos, transposones o fragmentos lineales de DNA
obtenidos por hidrólisis de restricción o amplificación por PCR.

13

La selección del suceso de recombinación se efectúa por medio de un marcador genético seleccionable, como genes que confieran resistencia a antibióticos (por ejemplo canamicina, eritromicina, cloramfenicol o gentamicina), genes que confieran resistencia a metales pesados y/o compuestos tóxicos o genes que complementen mutaciones auxotróficas (por ejemplo *pur*, *leu*, *met*, *aro*)

Procedimiento a) y f) Subregulación/eliminación de antígenos variables e inmunodominantes no protectores

Muchos antígenos de superficie son variables entre las cepas bacterianas y como consecuencia son protectores solo frente a un conjunto limitado de cepas estrechamente relacionadas. Un aspecto de esta invención cubre la reducción de la expresión, o preferiblemente, la supresión del (de los) gen(es) que codifica(n) la(s) proteína(s) de superficie variable(s), que da como resultado una cepa bacteriana que produce ampollas que, al administrarse en una vacuna, tienen un potencial más fuerte para la reactividad cruzada frente a diversas cepas debido a la mayor influencia ejercida por las proteínas conservadas (retenidas en las membranas externas) del sistema inmune de la vacuna. Los ejemplos de dichos antígenos variables incluyen por *Neisseria*, pelos (PilC) que experimentan variaciones antigénicas, PorA, Opa, TbpB y FrpB, por *H influenzae*, P2, P5, pilina, proteasa IgA1 y por *Moraxella* CopB, OMP106

Otros tipos de genes que podrían estar subregulados o desactivados son genes que, in vivo, pueden estar fácilmente activados (expresados) o desactivados por la bacteria. Como las

proteínas de membrana externa codificadas por dichos genes no están siempre presentes en la bacteria, la presencia de dichas proteínas en las preparaciones de ampolla puede ser también perjudicial para la eficacia de la vacuna por las razones indicadas anteriormente. Un ejemplo preferido para subregular o suprimir es la proteína Opc de *Neisseria*. La inmunidad anti-Opc inducida por una vacuna de ampollas que contiene Opc tendría sólo una capacidad protectora limitada, ya que el organismo infectante podría fácilmente hacerse Opc- HgpA y HgpB de *H influenzae* son otros ejemplos de dichas proteínas.

En el procedimiento a), estos genes variables no protectores están subreguladas en su expresión, o definitivamente desactivados. Esto tiene la sorprendente ventaja anteriormente mencionada de concentrar el sistema inmune en los mejores antígenos que están presentes en cantidades pequeñas en la superficie externa de las ampollas.

La cepa puede modificarse de esta manera mediante una serie de estrategias, incluyendo la inserción de transposón para desestabilizar la región de codificación o región promotora del gen, o mutaciones puntuales o supresiones para conseguir un resultado similar. La recombinación homóloga puede utilizarse también para suprimir un gen de un cromosoma (cuando la secuencia X comprende parte (preferiblemente toda) la secuencia de codificación del gen de interés). Además puede utilizarse para cambiar su promotor fuerte por un promotor más débil (o ninguno) (cuando la secuencia de nucleótidos X comprende parte (preferiblemente toda) la región promotora del gen, y la secuencia de nucleótidos Y comprende una región promotora más débil [que da como resultado una expresión reducida de (de los)

gen(es)/operon(es) de interes] o ninguna region promotora) En este caso es preferible para el suceso de recombinación que tenga lugar en la region del cromosoma 1000 pb cadena arriba del gen de interes

5 Como alternativa, Y puede conferir una actividad transcripcional condicional, que da como resultado una expresion condicional de(1) gen(es)/operon(es) de interes (subrregulacion) Esto es util en la expresion de moléculas que son toxicas o no están bien apoyadas por el huesped bacteriano

10 La mayoría de las proteínas antes ejemplificadas son OMP integrales y su variabilidad puede estar limitada solo a uno o pocos de sus bucles expuestos a la superficie Otro aspecto de esta invencion [procedimiento g] cubre la supresion de regiones de DNA que codifican estos bucles expuestos a la superficie
15 conservados Los bucles expuestos a la superficie de P2 y P5 de *H influenzae* son ejemplos preferidos de proteínas que podrian transformarse en antígenos de reacción cruzada utilizando dicho procedimiento De nuevo, la recombinacion homologa es un procedimiento preferido para realizar este procedimiento de
20 modificacion

Procedimiento b) Suministro y modulacion de promotor

Otro aspecto de la invencion se refiere a la modificacion de la composicion de ampollas por alteracion in situ de la
25 region regulatoria que controla la expresion del(de los) gen(es) y/o operon(es) de interés Esta alteración puede incluir el reemplazamiento parcial o total del promotor endogeno que controla la expresion de un gen de interes, por uno que confiere una actividad transcripcional distinta Esta actividad

transcripcional distinta puede conferirse por variantes (mutaciones puntuales, supresiones y/o inserciones) de las regiones de control endogeno, mediante promotores de origen natural o heterologos modificados o por una combinacion de
 5 ambos Dichas alteraciones conferirán preferiblemente una actividad transcripcional mas fuerte que la endógena (introducción de un promotor fuerte), dando como resultado una expresión aumentada del(de los) gen(es)/operon(es) de interes (sobrerregulacion) Dicho procedimiento es particularmente util
 10 para aumentar la produccion de componentes de ampollas inmunológicamente relevantes, como proteínas de membrana externa y lipoproteinas (preferiblemente OMP conser̄vadas, habitualmente presentes en las ampollas a bajas concentraciones)

Los tipicos promotores fuertes que pueden estar integrados
 15 en *Neisseria* son porA, [SEC N° ID 24], porB [SEC N° ID 26], IgtF, Opa, p110, lst y hpuAB PorA y PorB se prefieren como promotores constitutivos fuertes Se ha establecido (Ejemplo 9) que la actividad del promotor PorB esta contenida en un fragmento correspondiente a los nucleotidos -1 a -250 cadena arriba del
 20 codón de iniciacion de porB En *Moraxella*, se prefiere utilizar los promotores ompH, ompG, ompE, ompB1, ompB2, ompA, ompCD y omp106, y en *H influenzae* se prefiere integrar los promotores P2, P4, P1, P5 y P6

Utilizando la tecnologia de recombinacion homóloga de doble
 25 cruzamiento preferida para introducir el promotor en la region 1000 pb cadena arriba, los promotores pueden colocarse en cualquier sitio a 30-970 pb cadena arriba del codon de iniciación del gen a sobrerregular Aunque convencionalmente se cree que la region promotora deberia estar relativamente cerca

al marco de lectura abierto para obtener una optima expresion del gen, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la colocacion del promotor lejos del codon de iniciacion da como resultado un gran aumento de los niveles de expresion. Por ello se prefiere que el promotor se inserte a 200-600 pb del codon de iniciación del gen, más preferiblemente a 300-500 pb, y lo mas preferido es a aproximadamente 400 pb del ATG de iniciacion

10

Procedimiento c)- Componentes de la ampolla producidos condicionalmente

La expresion de algunos genes que codifican ciertos componentes de la ampolla está cuidadosamente regulada. La produccion de los componentes esta condicionalmente modulada y depende de diversas señales metabólicas y/o ambientales. Dichas señales incluyen, por ejemplo, la limitacion de hierro, la modulacion del potencial redox, las variaciones de pH y temperatura y cambios nutricionales. Algunos ejemplos de componentes de ampolla conocidos por ser producidos condicionalmente incluyen proteínas de membrana externa reguladas por hierro de *Neisseria* y *Moraxella* (por ejemplo TbpB, LbpB) y porinas de membrana externa inducibles por sustrato. La presente invencion cubre el uso de los procedimientos geneticos descritos anteriormente (procedimiento a) o b)) para hacer la expresion de dichas moléculas constitutiva. De esta manera, la influencia de la señal ambiental sobre la expresion del (de los) gen(es) de interes puede ser superada por la

12

modificacion/reemplazamiento de la región de control correspondiente del gen, de modo que se vuelva constitutivamente activo (por ejemplo suprimiendo parte [preferiblemente toda] la secuencia de control represivo, por ejemplo la region 5 operadora), o insertando un promotor constitutivo fuerte Para los genes regulados por hierro puede eliminarse el operador fur Como alternativa, puede utilizarse el procedimiento 1) para suministrar una copia adicional del gen/operón de interés en el cromosoma que está colocado artificialmente bajo el control de 10 un promotor constitutivo

Procedimientos d) y e) Detoxificación de LPS

La toxicidad de las vacunas de ampollas presenta uno de los mayores problemas en el uso de ampollas en vacunas Otro aspecto 15 de la invencion se refiere a procedimientos de detoxificacion genetica del LPS presente en las ampollas El lipido A es el componente primario de LPS responsable de la activación celular Muchas mutaciones en genes implicados en esta ruta conducen a los fenotipos esenciales Sin embargo, las mutaciones de los 20 genes reponsables de las etapas de modificaciones terminales conducen a fenotipos sensibles a la temperatura (htrB) o permisivos (msbB) Las mutaciones que dan como resultado una expresion reducida (o ninguna) de estos genes dan como resultado una actividad toxica alterada del lipido A Ciertamente los 25 lipidos A no lauroilados (mutante htrB) o no miristoilados (mutante msbB) son menos toxicos que el lipido A de tipo silvestre Las mutaciones en el gen de codificación de la 4'-quinasa del lipido A (lpkK) reducen tambien la actividad toxica del lipido A

U

El procedimiento d) implica así la supresión de parte (o preferiblemente todo) de uno o mas de los marcos de lectura abiertos o promotores anteriores. Como alternativa, los promotores pueden reemplazarse por promotores más debiles.

5 Preferiblemente se utilizan las tecnicas de recombinacion homologa descritas anteriormente para llevar a cabo el procedimiento

Las secuencias de los genes htrB y msbB de *Neisseria meningitidis* B, *Moraxella catarrhalis*, y *Haemophilus influenzae*

10 se dotan adicionalmente con este fin-

La actividad toxica de LPS podria, alterarse también introduciendo mutaciones en los genes/loci implicados en la resistencia a polimixina B (dicha resistencia se ha correlado con la adiccion de aminoarabinosa en el fosfato 4' del lipido A)

15 Estos genes/loci podrian ser pmrE que codifica una UDP-glucosa deshidrogenasa, o una región de genes de resistencia de peptidos antimicrobianos comun a muchas enterobacterias que podria estar implicada en la sintesis y transferencia de aminoarabinosa. El gen pmrF que esta presente en esta región codifica una dolicol-fosfato manosiltransferasa (Gunn, J S , Kheng, B L , Krueger, J , Kim, K , Guo, L , Hackett, M , Miller, S I , 1998, *Mol Microbiol* 27 1171-1182)

20

Las mutaciones en el sistema regulatorio PhoP-PhoQ, que es un sistema regulatorio de dos componentes con fosforele (f i fenotipo constitutivo PhoP, PhoP^c) o bajo Mg⁺⁺ ambiental o condiciones de cultivo (que activan el sistema regulatorio PhoP-PhoQ) conducen a la adiccion de aminoarabinosa al fosfato 4' y a 2-hidroximiristato reemplazando al miristato (hidroxilación del miristato). Este lipido A modificado muestra una capacidad

25

reducida de estimular la expresion de E-selectina por células endoteliales humanas y secrecion de TNF- α de monocitos humanos

El procedimiento e) implica la sobrerregulacion de estos genes utilizando una estrategia como la descrita anteriormente
5 (incorporando promotores fuertes, utilizando preferiblemente técnicas de recombinacion homologa para llevar a cabo el procedimiento)

Como alternativa, mas que realizar cualquiera de dichas mutaciones, podria utilizarse una cepa resistente a polimixina B
10 como cepa de produccion de vacuna (conjuntamente con uno o mas de los demas procedimientos de la invencion), puesto que las ampollas de dichas cepas tambien tienen toxicidad de LPS reducida (por ejemplo como muestran, para meningococos, van der Ley, P , Hamstra, H J , Kramer, M , Steeghs, L , Petrov, A y
15 Poolman, J T , 1994, en Proceedings of the ninth international pathogenic Neisseria conference The Guildhall, Winchester, Inglaterra)

Como otra alternativa (y otro aspecto de la invencion) los inventores proporcionan un procedimiento de detoxificación de
20 una cepa bacteriana Gram negativa que comprende las etapas de cultivar la cepa en un medio de crecimiento que contiene 0,1 mg-100 g de aminoarabinosa por litro de medio

Como otra alternativa mas, pueden añadirse peptidos sintéticos que imitan la actividad de union de la polimixina B
25 (descrita a continuación) a la preparación de ampollas para reducir la actividad toxica de LPS (Rustici, A , Velucchi, M , Faggioni, R , Sironi, M , Ghezzi, P , Quataert, S , Green, B , y Porro, M , 1993 Science 259 361-365, Velucchi, M , Rustici, A , Meazza, C , Villa, P , Ghezzi, P y Porro, M , 1997 J Endotox

Procedimiento f) Fijacion de proteínas homologas o heterólogas a ampollas de membrana externa reduciendo la toxicidad de LPS

5 Otro aspecto de esta invencion cubre el uso de secuencias geneticas que codifican peptidos de polimixina B (o análogos de estos) como medio de dirigir proteínas de fusión a la membrana externa. La polimixina B es un peptido ciclico compuesto por aminoácidos no codificados por tRNA (producidos por organismos
10 actinomicetos Gram positivos) que se unen muy fuertemente a la parte lipido A del LPS presente en la membrana externa. Esta union reduce la toxicidad intrinseca de LPS (actividad endotoxina). Se han desarrollado péptidos que imitan la estructura de la polimixina B compuestos por aminoácidos
15 canónicos (codificados por tRNA) y tambien se unen a lípido A con una fuerte afinidad. Estos peptidos se han utilizado para detoxificar LPS. Uno de estos péptidos, conocido como SAEP-2 (Nterminal-Lys-Thr-Lys-Cys-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Cys-Cterminal), se mostro muy prometedor a este respecto (Molecular Mapping and
20 detoxifying of the Lipid A binding site by sinthetic peptides (1993) Rustici, A , Velucchi, M , Faggioni, R , Sironi, M , Ghezzi, P , Quataert, S , Green, B , y M , Porro Science 259 361-365)

El presente procedimiento f) de la invención proporciona
25 una mejora de este uso. La solicitante ha encontrado que el uso de secuencias de DNA que codifican el peptido SEAP-2 (o derivados de este), fusionadas genéticamente a un gen de interes (que codifique por ejemplo un antígeno de celula T, o un antígeno protector que habitualmente se segrega como una toxina, o una

proteína ~~citósólica-o-periplasmica~~) es un medio para dirigir la correspondiente proteína recombinante a la membrana externa de un huésped bacteriano preferido (reduciendo al mismo tiempo la toxicidad de LPS)

5 Este sistema es adecuado para proteínas lábiles que no estarían expuestas directamente en el exterior de la ampolla. Por lo tanto la ampolla actuaría como un vehículo de suministro que expondría la proteína al sistema inmune una vez la ampolla fuera absorbida por las células T. Como alternativa, la fusión
10 genética debería comprender también un péptido señal o dominio transmembrana de modo que la proteína recombinante pudiera cruzar la membrana externa para exponerse al sistema inmune del huésped.

Esta estrategia de direccionamiento podría ser de particular interés en el caso de genes que codifican proteínas que no se dirigen normalmente a la membrana externa. Esta metodología permite también el aislamiento de ampollas recombinantes enriquecidas en la proteína de interés. Preferiblemente, dicha señal peptídica de direccionamiento
15 permite el enriquecimiento de las ampollas de membrana externa en varias proteínas de interés, que no se encuentran naturalmente en esa localización subcelular dada. Una lista no exhaustiva de bacterias que pueden utilizarse como huésped receptor para dicha producción de ampollas recombinantes incluye
20 *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae*.

Aunque se prefiere que el gen para la construcción sea modificado en el cromosoma de la bacteria [utilizando el

procedimiento 1], una realizacion preferida alternativa para las proteínas recombinantes de cola SAEP-2 es prepararlas independientemente y unir las en una etapa posterior a una preparacion de ampolla

5 Otra realización es el uso de dichas construcciones en un procedimiento de purificación de proteína. El sistema podría utilizarse como parte de un sistema de expresion para la produccion de proteínas recombinantes en general. La cola SAEP-2 del peptido puede utilizarse para la purificacion de afinidad de
10 la proteína a la que esta unida, utilizando una columna que contenga moléculas de lipido A inmovilizadas

Procedimiento h) Polisacaridos de reacción cruzada

El aislamiento de ampollas de membrana externa bacteriana a
15 partir de bacterias encapsuladas Gram negativas da como resultado a menudo la copurificación del polisacarido capsular. En algunos casos, este material "contaminante" puede mostrarse útil, ya que el polisacárido puede activar la respuesta inmune conferida por otros componentes de la ampolla. En otros casos,
20 sin embargo, la presencia de material polisacarido contaminante en las preparaciones de ampollas bacterianas puede mostrarse perjudicial para el uso de ampollas en una vacuna. Por ejemplo, se ha mostrado que, al menos en el caso de *N meningitidis*, que el polisacárido capsular del serogrupo B no confiere inmunidad
25 protectora y es susceptible de inducir una respuesta autoinmune adversa en humanos. Consiguientemente, el procedimiento h) de la invencion es la modificacion de la cepa bacteriana para la produccion de ampollas de modo que -esten exentas de polisacarido capsular. Las ampollas serán entonces adecuadas para su uso en

humanos. Un ejemplo particularmente preferido de dicha preparacion de ampolla es el del serogrupo B de *N meningitidis* desprovisto de polisacarido capsular.

Esto puede conseguirse utilizando cepas de produccion de
 5 ampollas modificadas en las que los genes necesarios para la biosintesis y/o exportacion capsular se hayan dañado. La inactivacion del gen que codifica la biosintesis o exportacion capsular puede conseguirse por mutacion (mutación puntual, supresión o inserción) en la región de control, la region de
 10 codificación o ambas (utilizando preferiblemente las tecnicas de recombinacion homóloga descritas anteriormente). Además, la inactivacion de los genes de biosintesis capsular puede conseguirse tambien por sobreexpresion antisentido o mutagénesis de transposón. Un procedimiento preferido es la supresion de
 15 algunos o todos los genes de *Neisseria meningitidis* cps necesarios para la biosintesis y exportación de polisacarido. Con este fin puede utilizarse el plásmido de reemplazamiento pMF121 (descrito en Frosh et al, 1990, *Mol Microbiol* 4 1215-1218) para suministrar una mutacion suprimiendo la agrupación de
 20 genes cpsCAD(+gale). Como alternativa, podria suprimirse el gen siaD, o subrregularse su expresion (el gen siaD meningococcico codifica alfa-2,3-sialiltransferasa, una enzima necesaria para el polisacárido capsular y la sintesis de LOS). Dichas mutaciones pueden eliminar tambien las estructuras similares al
 25 huésped de la parte polisacarido del LPS de la bacteria.

Procedimiento 1) Suministro de una o mas copias de un gen y/o operon en un cromosoma huesped, o suministro de un gen y/o operón heterologo en un cromosoma huésped

3

Una estrategia eficiente para modular la composicion de una preparaci3n de ampolla es suministrar una o mas copias de un segmento de DNA que contiene un modulo de expresion en el genoma de una bacteria Gram negativa Una lista no exhaustiva de especies bacterianas preferidas que podrian utilizarse como receptores de dicho modulo incluye *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoe*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* El(los) gen(es) contenido(s) en el modulo de expresi3n pueden ser hom3logos (o endogenos) (es decir, existir naturalmente en el genoma de la bacteria manipulada) o heterologos (es decir, no existir naturalmente en el genoma de la bacteria manipulada) El m3dulo de expresion reintroducido puede constar de secuencias promotor/gen/oper3n "naturales" sin modificar o m3dulos de expresion modificados en los que la region promotora y/o la region de codificaci3n o ambas han sido alteradas Una lista no exhaustiva de promotores preferidos que podrian utilizarse para expresion incluye los promotores *porA*, *porB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *lst*, *hpuAB* de *N meningitidis* o *N gonorrhoe*, los promotores *p2*, *p5*, *p4*, *ompF*, *p1*, *ompH*, *p6*, *hln47* de *H influenzae*, los promotores *ompH*, *ompG*, *ompCD*, *ompE*, *ompB1*, *ompB2*, *ompA* de *M catarrhalis*, el promotor λ *pL*, *lac*, *tac*, *araB* de *Escherichia coli* o promotores reconocidos espec3ficamente por RNAPolimerasa de bacteri3fago como el bacteri3fago T7 de *E coli* Una lista no exhaustiva de los genes preferidos que podrian expresarse en dicho sistema incluye *NspA*, *omp85*, *PilQ*, complejo *TbpA/B*, *Hsf*, *PldA*, *HasR* de *Neisseria*, *MOMP*, *HMWP* de *Chlamydia*, *OMP106*, *HasR*, *PilQ*, *OMP85*, *PldA* de *Moraxella*, *FHA*, *PRN*, *PT* de *Bordetella pertussis*

En una realización preferida de la invención el módulo de expresión se suministra e integra en el cromosoma bacteriano por medio de recombinación específica homóloga y/o específica de sitio. Los vectores integrativos utilizados para suministrar dichos genes y/o operones pueden ser plásmidos condicionalmente replicativos o suicidas, bacteriofagos, transposones o fragmentos de DNA lineal obtenidos por hidrólisis de restricción o amplificación PCR. La integración se dirige preferiblemente a las regiones cromosómicas prescindibles para el crecimiento in vitro. Una lista no exhaustiva de loci preferidos que pueden utilizarse para dirigir la integración de DNA incluye los genes *porA*, *porB*, *opa*, *opc*, *rmp*, *omp26*, *lecA*, *cps*, *lgtB* de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*, los genes *P1*, *P5*, *hmw1/2*, *proteasasa IgA*, *fimE* de *NTH1* y los genes *lecA1*, *lecA2*, *omp106*, *uspA1*, *uspA2* de *Moraxella catarrhalis*. Como alternativa, el módulo de expresión utilizado para modular la expresión del(de los) componente(s) de la ampolla puede suministrarse en una bacteria de elección por medio de vectores episomiales como plásmidos replicativos circulares/lineales, cósmidos, fasmidos, bacteriofagos lisogénicos o cromosomas bacterianos artificiales. La selección del suceso de recombinación puede hacerse por medio de marcadores genéticos selectivos, como genes que confieren resistencia a antibióticos (por ejemplo canamicina, eritromicina, cloramfenicol o gentamicina), genes que confieren resistencia a metales pesados y/o compuestos tóxicos o genes que complementan mutaciones auxotróficas (por ejemplo, *pur*, *leu*, *met*, *aro*).

Genes heterólogos Expresión de proteínas extrañas en ampollas

69

de membrana externa

Las ampollas bacterianas de membrana externa representan un sistema muy atractivo de producir, aislar y suministrar proteínas recombinantes para vacunas, usos terapeuticos y/o de diagnostico. Otro aspecto de esta invencion es con respecto a la expresion, produccion y direccionamiento de proteínas heterólogas extrañas a la membrana externa, y al uso de las bacterias para producir ampollas recombinantes.

Un procedimiento preferido para conseguir esto es a traves de un procedimiento que comprende las etapas de introducción de un gen heterologo, opcionalmente controlado por una secuencia promotora fuerte, en el cromosoma de una cepa Gram negativa por recombinación homóloga. Las ampollas pueden prepararse a partir de la cepa modificada resultante.

Una lista no exhaustiva de bacterias que pueden utilizarse como huesped receptor para la produccion de ampollas recombinantes incluye *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae*. El gen expresado en dicho sistema puede ser de origen virico, bacteriano, fungico, parasito o eucariotico superior.

Una aplicación preferida de la invencion incluye un procedimiento para la expresion de proteínas de membrana externa de *Moraxella*, *Haemophilus* y/o *Pseudomonas* (integrales, politopicas y/o lipoproteinas) en ampollas recombinantes de *Neisseria meningitidis*. Los loci de integracion preferibles se indican anteriormente y los genes que se introducen preferiblemente son aquellos que proporcionan protección frente

a la bacteria de la que se aislan Los genes protectores preferidos para cada bacteria se describen a continuacion

Otras aplicaciones preferidas son ampollas producidas a partir de una cepa modificada de *Haemophilus influenzae* en la que el gen heterologo es un OMP protector de *Moraxella catarrhalis*, y ampollas producidas a partir de una cepa modificada de *Moraxella catarrhalis* en la que el gen heterologo es un OMP protector de *Haemophilus influenzae* (los loci preferidos para la inserción de genes se dieron anteriormente, y los antígenos protectores preferidos se describen a continuacion)

Una aplicacion particularmente preferida de este aspecto es en el campo de la profilaxis o tratamiento de enfermedades de transmision sexual (ETS) A menudo es dificil para los facultativos determinar si la causa principal de una ETS es una infección por gonococo o *Chlamydia trachomatis* Estos dos organismos son la causa principal de salpingitis, una enfermedad que puede conducir a esterilidad en el huésped Por lo tanto sería util si pudiera vacunarse contra una ETS, o tratarse, con una vacuna efectiva contra la enfermedad causada por ambos organismos La proteína de membrana externa mayoritaria (MOMP) de *C trachomatis* ha mostrado ser el objetivo de los anticuerpos protectores Sin embargo, la integridad estructural de esta proteína de membrana integral es importante para inducir dichos anticuerpos Además, los epitopos reconocidos por estos anticuerpos son variables y definen más de 10 serovariaciones El aspecto anteriormente descrito de esta invención permite el plegamiento adecuado de una o mas proteínas de membrana en una preparación de ampolla de membrana externa La modificación de

4

una cepa gonococcica que expresa multiples serovariaciones MOMP de *C trachomatis* en la membrana externa, y la produccion de ampollas de éstas, da una solucion simple a los multiples problemas de las proteinas de membrana plegadas correctamente, la presentacion de suficientes serovariaciones de MOMP para proteger frente a un amplio espectro de serovariaciones, y la profilaxis/tratamiento simultaneo de infeccion gonocóccica (y consiguientemente la falta de necesidad de que los facultativos decidan inicialmente cual organismo está causando los sintomas clinicos particulares, puede vacunarse frente a ambos organismos simultaneamente, permitiendo así el tratamiento de la ETS en una etapa muy temprana) Los loci preferidos para la insercion de genes en el cromosoma gonococcico se dieron anteriormente Otros genes protectores preferidos de *C trachomatis* que podrian incorporarse son HMWP, PmpG y aquellos OMP descritos en el documento WO 99/28475

Direccionamiento de las proteinas heterologas a las ampollas de membrana externa

La expresión de algunas proteinas heterólogas en ampollas bacterianas requiere la adiccion de señal(es) de direccionamiento de membrana externa El procedimiento preferido para solucionar este problema es creando una fusion genética entre un gen heterologo y un gen que codifique una OMP residente como aproximación especifica para dirigir las proteinas recombinantes a las ampollas Lo mas preferido es que el gen heterólogo esté fusionado a las secuencias de péptido señal de dicha OMP

Preparaciones de ampollas neisséricas

25

Se prefieren uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) para la sobrerregulación mediante los procedimientos b) y/o 1) llevados a cabo en una cepa neisserica, incluyendo gonococos y meningococos

5 (particularmente *N meningitidis* B) NspA (documento WO 96/29412), similar a Hsf (documento WO 99/31132), Hap (documento PCT/EP99/02766), PorA, PorB, OMP85 (documento WO 00/23595), PilQ (documento PCT/EP99/03603), PldA (documento PCT/EP99/06718), FrpB (documento WO 96/31618), TbpA (documento US 5 912 336),

10 TbpB, FrpA/FrpC (documento WO 92/01460), LbpA/LbpB (documento PCT/EP98/05117), FhaB (documento WO 98/02547), HasR (documento PCT/EP99/05989), lipo02 (documento PCT/EP99/08315), Tbp2 (documento WO 99/57280), MltA (documento WO 99/57280) y ctrA (documento PCT/EP00/00135) También se prefieren genes que

15 puedan introducirse heterológicamente en otras bacterias Gram negativas

Uno o mas de los siguientes genes son preferidos para la subregulación a través del procedimiento a) PorA, PorB, PilC, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, Opa y Opc

20 Uno o mas de los siguientes genes son preferidos para la subregulación a través del procedimiento d) htrB, msbB y lpxK

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la sobrerregulación a través del procedimiento e) pmrA, pmrB, pmrE y pmrF

25 Las secuencias de control represivo preferidas para el procedimiento c) son la región del operador fur (particularmente para uno o ambos genes TbpB o LbpB) y la región del operador DtxR

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la

subregulación a través del procedimiento h) *galE*, *siaA*, *siaB*, *siaC*, *siaD*, *ctrA*, *ctrB*, *ctrC* y *ctrD*

Preparación de ampollas de *Pseudomonas aeruginosa*

5 Uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) son preferidos para la sobrerregulación a través de los procedimientos b) y/o 1) *PcrV*, *OprF*, *OprI*. También son preferidos como genes que pueden introducirse heterológamente en otras bacterias Gram negativas

10

Preparaciones de ampollas de *Moraxella catarrhalis*

 Uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) son preferidos para la sobrerregulación a través de los procedimientos b) y/o 1) *OMP106* (documentos WO 97/41731 y
15 WO 96/34960), *HasR* (documento PCT/EP99/03824), *PilQ* (documento PCT/EP99/03823), *OMP85* (documento PCT/EP00/01468), *lipo06* (documento GB 9917977 2), *lipo10* (documento GB 9918208 1), *lipo11* (documento GB 9918302 2), *lipo18* (documento GB 9918038 2), *P6* (documento PCT/EP99/03038), *ompCD*, *CopB*
20 (Helminen, M E et al, (1993) Infect Immun 61 2003-2010), *D15* (documento PCT/EP99/03822), *Omp1A1* (documento PCT/EP99/06781), *Hly3* (documento PCT/EP99/03257), *LbpA* y *LbpB* (documento WO 98/55606), *TbpA* y *Tbp B* (documentos WO 97/13785 y WO 97/32980), *OmpE*, *UspA1* y *UspA2* (documento WO 93/03761) y *Omp21*. También son
25 preferidos como genes que pueden introducirse heterológamente en otras bacterias Gram negativas

 Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la subregulación a través del procedimiento a) *CopB*, *OMP106*, *OmpB1*, *TbpA*, *TbpB*, *LbpA* y *LbpB*

54

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la subregulación a través del procedimiento d) htrB, msbB y lpxK

Uno o mas de los siguientes genes son preferidos para la sobrerregulación a través del procedimiento e) pmrA, pmrB, pmrE

5 y pmrF

Preparaciones de ampollas de *Haemophilus influenzae*

Uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) son preferidos para la sobrerregulación a través de
10 los procedimientos b) y/o i) D15 (documento WO 94/12461), P6 (documento EP 281673), TbpA, TbpB, P2, P5, (documento WO 94/26304), OMP26 (documento WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hsf, Hap, Hln47 y Hif (todos los genes en este operón deben estar sobrerregulados para sobrerregular la pilina)
15 También son preferidos como genes que pueden introducirse heterológicamente en otras bacterias Gram negativas

Uno o mas de los siguientes genes son preferidos para la subregulación a través del procedimiento a) P2, P5, Hif, proteasa IgA1, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, TbpA y TbpB

20 Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la subregulación a través del procedimiento d) htrB, msbB y lpxK

Uno o mas de los siguientes genes son preferidos para la sobrerregulación a través del procedimiento e) pmrA, pmrB, pmrE y pmrF

25

Formulaciones de vacuna

Una realización preferida de la invención es la formulación de las preparaciones de ampolla de la invención en una vacuna que puede comprender también un excipiente farmacéuticamente

aceptable

La fabricación de preparaciones de ampollas a partir de cualquiera de las cepas modificadas antes mencionadas puede conseguirse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos por el experto. Se utilizan preferiblemente los procedimientos descritos en los documentos EP 301992, US 5 597 572, EP 11243 o US 4 271 147. Lo más preferido es utilizar el procedimiento descrito en el Ejemplo 8.

La preparación de vacunas se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (Eds Powell M F & Newman M J) (1995) Plenum Press, Nueva York).

Las preparaciones de ampollas de la presente invención pueden coadyuarse en la formulación de vacuna de la invención. Los coadyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio como hidróxido de aluminio gel (alumina) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio (particularmente carbonato de calcio), hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados, derivados catiónicos o aniónicos de polisacáridos o polifosfatos.

Los sistemas coadyuvantes de Tñ1 adecuados que pueden utilizarse incluyen monofosforil-lípido A, particularmente monofosforil-lípido A 3-desoxiacilado, y una combinación de monofosforil-lípido A, preferiblemente monofosforil-lípido A 3-desoxiacilado (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Un sistema mejorado implica la combinación de monofosforil-lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 está inactivado con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739.

Una formulación de coadyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO95/17210 y es una formulación preferida

5 La vacuna puede comprender una saponina, mas preferiblemente QS21. También puede comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Los oligonucleótidos que contienen CpG sin metilar (documento WO 96/02555) también son inductores preferenciales de una respuesta TH1 y adecuados para su uso en
10 la presente invención

 La preparación de vacuna de la presente invención puede utilizarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible de infección por medio de la administración de la citada vacuna a través de vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden
15 incluir la inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea, o por administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. Así pues, un aspecto de la presente invención es un procedimiento de inmunizar a un huésped humano contra una enfermedad causada por
20 una infección de una bacteria gram negativa, tal método comprende la administración al huésped de una dosis inmunoprotectora de la preparación de ampolla de la presente invención

 La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se
25 selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos en las vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico utilizado y de cómo se presente. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda 1-100 µg de antígeno de

proteína, preferiblemente 5-50 μ g, y lo mas típico en el intervalo de 5-25 μ g

Puede determinarse una cantidad óptima para una vacuna particular por estudios estándares que implican la observacion de respuestas inmune apropiadas en sujetos A continuación de la vacunación inicial los sujetos pueden recibir una o más inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas

Vacunas de celula enteras fantasma-o muertas

Los inventores consideran que las mejoras anteriores para las preparaciones de ampollas y vacunas pueden extenderse facilmente a preparaciones y a vacunas de celulas enteras fantasma o muertas (con identicas ventajas) Las cepas Gram negativas modificadas de la invención de las que se preparan las ampollas pueden utilizarse también para hacer preparaciones de células enteras fantasma o muertas Los procedimientos para hacer preparaciones fantasma (celúlas vacias con las cubiertas intactas) a partir de cepas Gram negativas son bien conocidos en la técnica (vease por ejemplo el documento WO 92/01791) Los procedimientos de matar celulas enteras para hacer preparaciones de celulas inactivadas para su uso en vacunas son también bien conocidos Los terminos "preparaciones de ampollas" y "vacunas de ampollas" como también en los procedimientos descritos a lo largo de este documento son por lo tanto aplicables a los terminos "preparacion fantasma" y "vacuna fantasma" y "preparación de celulas enteras muertas" y "vacuna de células enteras muertas", respectivamente, con los fines de esta invencion

56

Combinación de los procedimientos a)-1)

Puede apreciarse que pueden utilizarse uno o mas de los procedimientos anteriores para producir una cepa modificada de la que hacer preparaciones mejoradas de ampollas de la invención. Preferiblemente se utiliza uno de dichos procedimientos, mas preferiblemente dos o más de los procedimientos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 89) se usan para fabricar la vacuna de ampolla. Segun se utiliza un procedimiento adicional en la fabricacion de la vacuna de ampolla, cada mejora funciona conjuntamente con los demás procedimientos utilizados para hacer una preparación de ampolla modificada optimizada.

Una preparacion de ampolla meningocócica preferida (particularmente de *N meningitidis* B) comprende el uso de los procedimientos a), b), d) y/o e) y h). Dichas preparaciones de ampollas son seguras (no hay estructuras similares a las estructuras huésped), no toxicas y estructuradas de manera que la respuesta inmune del huésped estara enfocada en altos niveles de antigenos protectores (y preferiblemente conservados). Todos los elementos anteriores funcionan conjuntamente para proporcionar una vacuna de ampolla optimizada.

De forma similar para *M catarrhalis* y *H influenzae* no tipificable, las preparaciones de ampolla preferidas comprenden el uso de los procedimientos a), b) y d) y/o e).

Otro aspecto de la invencion es, de esta manera, una vacuna de celulas enteras muertas o fantasma Gram negativa inmunoprotectora y no toxica, adecuada para uso pediatrico.

Para uso pediatrico significa uso en infantes menores de 4 años de edad.

Inmunoprotectora significa que al menos un 40% (y

5

preferiblemente el 50, 60, 70, 80, 90 y 100%) de seroconversion en infantes (aumento de 4 veces la actividad bactericida [dilución de los antisueros a la que mueren el 50% de las bacterias, vease por ejemplo el documento PCT/EP98/05117])

5 frente a un conjunto de cepas heterologas que se seleccionan de los grupos clonales mayoritarios conocidos Para el meningococo B estas cepas deberían tener un tipo de PorA diferente de la cepa de producción de la ampolla, y deberían ser preferiblemente 2, 3, 4 o, lo mas preferido, las 5 cepas H44/76, M97/251078, 10 BZ10, NGP165 y CU385 Para *H influenzae* no tipificable, las cepas deberían ser preferiblemente 2, 3, 4 o, lo más preferido, las 5 cepas 3224A, 3219C, 3241A, 640645 y A840177 Para *M catarrhalis* las cepas deberían ser preferiblemente 2, 3, 4 o, lo mas preferido, las 5 cepas ATCC 43167, 14, 358, 216 y 2926

15 No tóxico significa que existe una reducción significativa (2-4 veces, preferiblemente 10 veces) de la actividad endotoxina medida por el bien conocido LAL y por ensayos de pirogenicidad

Combinaciones de vacuna

20 Otro aspecto de la invención son combinaciones de vacunas que comprenden las preparaciones de ampollas de la invención con otros antígenos que se utilizan ventajosamente frente a ciertos estados de enfermedad La solicitante ha encontrado que las ampollas son particularmente útiles para formulación con otros 25 antígenos, puesto que ventajosamente tienen un efecto coadyuvante sobre los antígenos con los que se mezclan

En una combinación preferida, las preparaciones de ampolla de meningococo B se formulan con 1, 2, 3 o preferiblemente los 4 siguientes polisacáridos capsulares meningocócicos que pueden

estar solos o conjugados a un vehículo proteína A, C, Y o W
 Dicha vacuna puede utilizarse ventajosamente como vacuna
 meningocócica global Más que utilizar las preparaciones de
 ampollas de meningococo B de la invención, se considera también
 5 que la formulación podría contener alternativamente
 preparaciones de ampollas de meningococo B de tipo silvestre de
 2 o más (preferiblemente varias) cepas pertenecientes a varios
 subtipos/serotipos (por ejemplo elegidos de P1 15, P1 7, 16,
 P1 4 y P1 2)

10 En otra realización preferida, las preparaciones de
 ampollas de meningococo B de la invención [o la mezcla antes
 mencionada de 2 o más preparaciones de ampollas de meningococo B
 de tipo silvestre], preferiblemente formuladas con 1, 2, 3 o los
 4 polisacáridos capsulares meningocócicos solos o conjugados A,
 15 C, Y o W, se formulan con un polisacárido capsular conjugado de
H influenzae b, y uno o más polisacáridos capsulares
 pneumocócicos conjugados o solos Opcionalmente, la vacuna puede
 comprender también uno o más antígenos de proteína que pueden
 proteger a un huésped frente a infección por *Streptococcus*
 20 *pneumoniae* Dicha vacuna puede utilizarse ventajosamente como
 una vacuna de meningitis global

Los antígenos polisacáridos capsulares pneumocócicos se
 seleccionan preferiblemente de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B,
 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20,
 25 22F, 23F y 33F (lo más preferido de los serotipos 1, 3, 4, 5,
 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F)

Los antígenos de proteína pneumocócicos preferidos son
 aquellas proteínas pneumocócicas que están expuestas a la
 superficie externa del pneumococo (capaces de ser reconocidas

por el sistema inmune del huésped durante al menos parte del
 ciclo vital del pneumococo) o son proteínas que se segregan o
 liberan por el pneumococo. Lo más preferido es que la proteína
 sea una toxina, adhesina, transductor de señal de 2 componentes
 5 o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o fragmentos de
 ésta. Las proteínas particularmente preferidas incluyen, pero no
 están limitadas a, pneumolisina (preferiblemente detoxificada
 por tratamiento químico o mutación) [Mitchell et al. *Nucleic
 Acids Res* 11 Jul 1990, 18(13) 4010 "Comparison of pneumolysin
 10 genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2",
 Mitchell et al. *Biochim Biophys Acta* 23 Ene 1989, 1007(1) 67-
 72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*
 rapid purification and biological properties", documento WO
 96/05859 (A Cyanamid), documento WO 90/06951 (Paton et al),
 15 documento WO 99/03884 (NAVA)], PspA y variantes de supresión
 transmembrana de éstas (documento US 5804193 - Briles et al),
 PspC y variantes de supresión transmembrana de estas (documento
 WO 97/09994 - Briles et al), PsaA y variantes de supresión
 transmembrana de éstas (Berry & Paton, *Infect Immun* Dic 1996,
 20 64(12) 5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 36-kilodalton
 putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus
 pneumoniae*"), proteínas de unión a colina pneumococcica y
 variantes de supresión transmembrana de estas, CbpA y variantes
 de supresión transmembrana de estas (documentos WO 97/41151, WO
 25 99/51266), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Infect
 Immun* 1996, 64 3544), HSP70 (documento WO 96/40928), PcpA
 (Sanchez-Beato et al, *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164 207-214),
 proteínas similares a M, solicitud de patente SB n° EP 0837130 y
 adhesina 18627, solicitud de patente SB n° EP 0834568. Otros

26

antigenos de proteina pneumocócica preferidos son los descritos en el documento WO 98/18931, particularmente los seleccionados de los documentos WO 98/18930 y PCT/US99/30390

En otra realizacion preferida, las preparaciones de
5 ampollas de *Moraxella catarrhalis* de la invencion se formulan con uno o más polisacáridos capsulares pneumococicos solos o conjugados, y uno o más antigenos que pueden proteger a un huesped frente a una infeccion de *H influenzae* no tipificable. Opcionalmente, la vacuna puede comprender tambien uno o mas
10 antigenos de proteina que pueden proteger a un huesped de infección por *Streptococcus pneumoniae*. La vacuna tambien puede comprender opcionalmente uno o mas antigenos que pueden proteger a un huesped frente a RSV y/o uno o mas antigenos que pueden proteger a un huesped frente al virus de la gripe. Dicha vacuna
15 puede utilizarse ventajosamente como vacuna global de otitis media

Los antigenos de proteina de *H influenzae* no tipificables preferidos incluyen las proteinas de fimbrina (documento US 5766608) y las fusiones que comprenden los péptidos de éstas
20 (por ejemplo la fusion LB1) (documento US 5843464 - Ohio Research Foundation), OMP26, P6, proteina D, TbpA, TbpB, H1a, Hmwl, Hmw2, Hap y D15

Los antigenos del virus de la gripe preferidos incluyen virus enteros, vivos o inactivados, virus de la gripe dividido,
25 crecido en ovulos de celulas MDCK o células Vero o virosomas de la gripe enteros (como los descritos por R Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteinas purificadas o recombinantes de éstos, como proteinas HA, NP, NA o M, o combinaciones de estas

Los antigenos preferidos de RSV (virus respiratorio

3
6

sincitial) incluyen la glicoproteína F, la glicoproteína G, la proteína NH o derivados de estas

En otra realización preferida mas, las preparaciones de ampollas de *H influenzae* no tipificable de la invencion se
5 formulan con uno o mas polisacaridos capsulares pneumocócicos solos o conjugados y uno o mas antigenos que pueden proteger a un huésped frente a infeccion por *M catarrhalis* Opcionalmente, la vacuna puede comprender también uno o mas antigenos que pueden proteger a un huesped frente a RSV y/o uno o mas
10 antigenos que pueden proteger a un huésped frente al virus de la gripe Dicha vacuna puede utilizarse ventajosamente como vacuna global de otitis media

Secuencias de nucleotidos de la invención

15 Otro aspecto de la invencion se refiere a la provision de nuevas secuencias de nucleótidos que pueden utilizarse en los procedimientos de la invencion Se proporcionan regiones especificas cadena arriba de diversos genes de diversas cepas, que pueden utilizarse en, por ejemplo, los procedimientos a),
20 b), d) y h) Ademas, se proporcionan regiones de codificacion para realizar el procedimiento d)

Procedimiento general para el analisis de la region adyacente no codificante de un gen bacteriano y su explotacion para la
25 *expresion modulada del gen en ampollas*

Las regiones adyacentes no codificantes de un gen especifico contienen los elementos regulatorios importantes en la expresion del gen Esta regulacion tiene lugar tanto a nivel transcripcional como de traduccion La secuencia de estas

64

regiones, tanto cadena arriba como cadena abajo del marco de lectura abierto del gen, puede obtenerse por secuenciación del DNA. Esta información de la secuencia permite la determinación de los motivos regulatorios potenciales como los diferentes
5 elementos promotores, secuencias de terminación, elementos de secuencia inducibles, represores, elementos responsables de la variación de fase, la secuencia Shine-Dalgarno, regiones con estructura secundaria potencial implicada en la regulación, así como otros tipos de motivos o secuencias regulatorias

10 Esta información de la secuencia permite la modulación de la expresión natural del gen en cuestión. La sobrerregulación de la expresión del gen puede conseguirse mediante la alteración del promotor, de la secuencia Shine-Dalgarno, del represor potencial o de los elementos del operador o de cualquier otro
15 elemento implicado. Asimismo, puede conseguirse la sobrerregulación de la expresión mediante tipos similares de modificaciones. Como alternativa, cambiando las secuencias de variación de fase, la expresión del gen puede ponerse bajo el control de la variación de fase, o puede desacoplarse de esta
20 regulación. En otra aproximación, la expresión del gen puede ponerse bajo el control de uno o más elementos inducibles que permitan la expresión regulada. Los ejemplos de dicha regulación incluyen, pero no están limitados a, inducción por cambio de la temperatura, adición de sustratos de inductor como carbohidratos
25 seleccionados o sus derivados, elementos traza, vitaminas, cofactores, iones metálicos, etc

Dichas modificaciones, como las descritas anteriormente, pueden introducirse mediante diferentes medios. La modificación de las secuencias implicadas en la expresión de los genes puede

19

hacerse in vivo por mutagénesis aleatoria seguida de seleccion del fenotipo deseado Otra aproximacion consiste en aislar la region de interes y modificarla por mutagénesis aleatoria o reemplazamiento dirigido a sitio, mutagenesis de insercion o
5 supresión La region modificada puede reintroducirse entonces en el genoma bacteriano por recombinacion homóloga, y puede evaluarse el efecto de la expresion del gen En otra aproximación, puede utilizarse el conocimiento de la secuencia de la región de interes para reemplazar o suprimir toda o parte
10 de las secuencias regulatorias naturales En este caso, la región regulatoria objetivo se aísla y modifica para que contenga los elementos regulatorios de otro gen, una combinacion de elementos regulatorios de diferentes genes, una region regulatoria sintetica o cualquier otra region regulatoria, o
15 para suprimir partes seleccionadas de las secuencias regulatorias de tipo silvestre Estas secuencias modificadas pueden reintroducirse entonces en la bacteria a través de recombinacion homologa en el genoma

En el procedimiento b), por ejemplo, la expresion de un gen
20 puede modularse por intercambio de su promotor con un promotor mas fuerte (a través del aislamiento de la secuencia cadena arriba del gen, modificacion in vitro de esta secuencia y reintroduccion en el genoma por recombinación homóloga) La expresion sobrerregulada puede obtenerse tanto en la bacteria
25 como en las vesiculas de membrana externa emitidas (o preparadas) por la bacteria

En otros ejemplos preferidos, pueden utilizarse las aproximaciones descritas para generar cepas bacterianas recombinantes con características mejoradas para las

aplicaciones de vacunas, como se describio anteriormente Estas pueden ser, pero no estan limitadas a, cepas atenuadas, cepas con expresion aumentada de antigenos seleccionados, cepas con knock-out (o expresion reducida) de los genes que interfieren con la respuesta inmune, y cepas con expresion modulada de proteínas inmunodominantes

Las SEC N° ID 2-23, 25, 27-38 son todas secuencias cadena arriba neissericas (cadena arriba del codón de iniciación de diversos genes preferidos) que comprenden aproximadamente 1000 pb cada una Las SEC N° ID 39-62 son todas secuencias cadena arriba de *M catarrhalis* (cadena arriba del codon de iniciacion de diversos genes preferidos) que comprenden aproximadamente 1000 pb cada una Las SEC N° ID 63-75 son todas secuencias cadena arriba de *H influenzae* (cadena arriba del codon de iniciacion de diversos genes preferidos) que comprenden aproximadamente 1000 pb cada una Todas éstas pueden utilizarse en procedimientos geneticos (particularmente en recombinacion homologa) para la sobrerregulación o subrregulacion de los marcos de lectura abiertos a los que estan asociadas (como se describio anteriormente) Las SEC N° ID 76-81 son las regiones de codificacion para los genes HtrB y MsbB de *Neisseria*, *M catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* Estas pueden utilizarse en procedimientos genéticos (particularmente de recombinación homóloga) para la subrregulacion (en particular la supresión) de parte (preferiblemente todos) de estos genes [procedimiento d)]

Otro aspecto de la invencion es, de esta manera, una secuencia de polinucleótidos aislada que hibrida en condiciones muy estrictas con al menos una parte de 30 nucleotidos de los nucleotidos de SEC N° ID 2-23, 25, 27-81 o una cadena

complementaria de estos Preferiblemente la secuencia aislada debería ser suficientemente larga para realizar la recombinación homologa con la secuencia cromosómica si es parte de un vector adecuado, particularmente al menos 30 nucleótidos
5 (preferiblemente al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos) Más preferiblemente, el polinucleótido aislado debería comprender al menos 30 nucleótidos (preferiblemente al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos) de SEC N° ID 2-23, 25, 27-81 o una
10 cadena complementaria de estos

Como se utilizan en la presente, las condiciones de hibridación muy estrictas incluyen, por ejemplo, SSC 6x, Denhardt 5x, SDS al 0,5% y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado hibridado durante la noche a 65°C
15 y lavado con SSC 2x, SDS al 0,1% una vez a temperatura ambiente durante alrededor de 10 minutos, seguido de una vez a 65°C durante alrededor de 15 minutos, seguido de al menos un lavado con SSC 0,2 x, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante al menos 3-5 minutos

20 Otro aspecto es el uso de las secuencias de polinucleótido aisladas de la invención para realizar un suceso de modificación genética (como inserción de transposón o mutación específica de sitio o supresión, pero preferiblemente un suceso de recombinación homologa) en las 1000 pb cadena arriba de un gen
25 cromosómico bacteriano Gram negativo, para aumentar o reducir la expresión del gen Preferiblemente la cepa en que el suceso de recombinación tiene lugar es la misma que la cepa de la que se obtuvieron las secuencias cadena arriba de la invención Sin embargo, los meningococos A, B, C, Y y W y los genomas de

68

gonococos son suficientemente similares para que la secuencia
cadena arriba de cualquiera de estas cepas pueda ser adecuada
para diseñar vectores para realizar dichos sucesos en las demás
cepas Este puede ser también el caso de *Haemophilus influenzae*
5 y *Haemophilus influenzae* no tipificable

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes se llevan a cabo utilizando las técnicas
10 estándares, que son bien conocidas y de rutina para los
expertos, excepto cuando, en caso contrario, se describen en
detalle Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la
invención

15 Ejemplo 1 Construcción de una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de polisacáridos capsulares

Se ha utilizado el plásmido pMF121 (Frosch et al, 1990) para
construir una cepa de *Neisseria meningitidis* B exenta de
20 polisacáridos capsulares El plasmido contiene las regiones
adyacentes del locus del gen que codifica la ruta biosintética
del polisacárido del grupo B (PS B) y el gen de resistencia a la
eritromicina La supresión del PS B dio como resultado la
perdida de expresión del polisacárido capsular del grupo B así
25 como la supresión en la copia activa de *galE*, que conduce a la
síntesis de LPS deficiente en galactosa

Transformación de cepas

Se selecciono la cepa H44/76 de *Neisseria meningitidis* B

By

(B 15 P1 7, 16, Los 3,7,9) para transformacion Después de incubacion durante la noche con CO₂ en placa de MH (sin eritromicina), se recogieron las células en MH liquido que contenia MgCl₂ 10 mM (se utilizaron 2 ml por placa de MH) y se
5 diluyeron hasta una DO de 0,1 (550 nm) A esta disolucion de 2 ml se añadieron 4 µl de disolución madre del plasmido pMF121 (0,5 µg/ml) durante un periodo de incubacion de 6 horas a 37°C (con agitacion) Se hizo un grupo control con la misma cantidad de bacteria *Neisseria meningitidis* B, pero sin adiccion de
10 plasmido Despues del periodo de incubación, se colocaron 100 µl de cultivo como tal y a diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 en placas de MH que contenian 5, 10, 20, 40 u 80 µg de eritromicina/ml antes de incubacion durante 48 horas a 37°C

15 Transferencia de colonias

Despues de incubacion en placa se crecieron 20 colonias y se seleccionaron de las placas de MH con 10 y 20 µg de eritromicina/ml, mientras que no hubo crecimiento de colonias en el grupo de control sin transformacion de plasmido La cepa tipo
20 silvestre H44/76 fue incapaz de crecer en las placas de eritromicina seleccionadas (10 a 80 µg de eritromicina/ml) El dia después se colocaron todas las colonias visibles en nuevas placas MH sin eritromicina para dejarlas crecer Despues, se transfirieron a láminas de nitrocelulosa (transferencia de
25 colonias) para ensayar la presencia de polisacarido B Resumiendo, se transfirieron las colonias a una lamina de nitrocelulosa y se aclararon directamente con PBS-Tween 20 al 0,05% antes de inactivacion celular durante 1 hora a 56°C en

20

PBS-Tween 20 al 0,05% (tampón diluyente) Después, se cubrió la membrana durante una hora con tampon diluyente a temperatura ambiente (RT) Después, se lavaron de nuevo las láminas tres veces durante 5 minutos con el medio de dilución antes de incubacion con Mab 735 PS anti-B (Boehringer) diluido a 1/3000 en el tampon diluyente durante 2 horas a temperatura ambiente Despues de una nueva etapa de lavado (3 veces, 5 minutos), se detecto el anticuerpo monoclonal con Ig anti-ratón biotinada de Amersham (RPN 1001) diluida 500 veces en el tampon diluyente (una hora a temperatura ambiente) antes de la siguiente etapa de lavado (como se describio anteriormente) Despues, se incubaron las láminas durante 1 hora a temperatura ambiente con una disolucion de complejo de estreptavidina-peroxidasa diluida 1/1000 en el tampon diluyente Después de las tres ultimas etapas de lavado utilizando el mismo procedimiento, se incubaron las laminas de nitrocelulosa durante 15 minutos en la oscuridad utilizando disolucion de revelado (30 mg de disolucion de 4-cloro-1-naftol en 10 ml de metanol mas 40 ml de PBS y 30 μ l de H₂O₂ al 37% de Merck) Se paro la reaccion con una etapa de lavado con agua destilada

ELISAS de células enteras

Se hicieron tambien ELISAS de celulas enteras utilizando las dos colonias transformadas ("D" y "R") y la cepa de tipo silvestre (H44/76) como bacterias de recubrimiento (20 μ g de proteina/ml), y se utilizaron un conjunto de distintos anticuerpos monoclonales para caracterizar las cepas de *Neisseria meningitidis* Se ensayaron los siguientes Mab PS anti-B (735 del Dr Frosch) y los demas Mab de NIBSC PS anti-B

21

(Ref 95/750), anti-P1 7 (A-PorA, Ref 4025), anti-P1 16 (A-PorA, Ref 95/720), anti-Los 3,7,9 (A-LPS, Ref 4047), anti-Los 8 (A-LPS, Ref 4048) y anti-P1 2 (A-PorA, Ref 95/696)

Se recubrieron la placas de microvaloracion (Maxisorp, Nunc) con 100 μ l de la disolución de celulas B meningococicas recombinantes durante la noche (ON) a 37°C en alrededor de 20 μ g/ml de PBS Después, se lavaron las placas tres veces con 300 μ l de NaCl 150 mM-Tween 20 al 0,05%, y se cubrieron con 100 μ l de PBS-caseina al 0,3% y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación Se lavaron de nuevo las placas utilizando el mismo procedimiento antes de incubacion con los anticuerpos Se utilizaron anticuerpos monoclonales (100 μ l) a diferentes diluciones (como muestra la Figura 2) en PBS-caseina al 0,3%, Tween 20 al 0,05% y se pusieron en microplacas antes de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación, antes de otra etapa identica de lavado Se añadieron 100 μ l de Ig antiraton (de conejo, Dakopatts E0413) conjugada a biotina y diluida a 1/2000 en PBS-caseina al 0,3%-Tween 20 al 0,05% a los pocillos para detectar los anticuerpos monoclonales unidos Después de la etapa de lavado (como anteriormente) se incubaron las placas con una disolucion de complejo estreptavidina-peroxidasa (100 μ l de RPN 1051 de Amersham) diluido a 1/4000 en la misma disolucion de trabajo durante 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de agitación Despues de esta agitacion y la ultima etapa de lavado, se incubaron las placas con 100 μ l de la disolución cromogena (4 mg de ortofenilendiamina (OPD) en 10 ml de tampon

22

citrato 0,1 M pH 4,5 con 5 μ l de H₂O₂) durante 15 minutos en la oscuridad. Se leyeron las placas a 490/620 nm utilizando un espectrofotómetro.

5 Resultados

La Figura 1 muestra que de las 20 colonias aisladas que eran capaces de crecimiento en los medios seleccionados con eritromicina, solo dos colonias (la "D" y la "R") mostraron ser negativas para la presencia de polisacárido B. Entre las demás, 16 eran claramente positivas para la presencia de PS B y resistentes a eritromicina. Esto indicaba que integraron el plasmido en su genoma, pero en la orientación incorrecta, y mantuvieron intacto el gen PS B y LPS (sin doble cruzamiento). Se ensayaron también controles positivos y negativos en las placas, y mostraron que la cepa NmB de tipo silvestre de H44/76 era claramente positiva para polisacárido B, mientras que las cepas meningococo A (A1) y meningococo C (C11) eran claramente negativas con este Mab 735 PS anti B. Estos resultados indican que alrededor del 10% de las colonias seleccionadas integraron correctamente el plasmido en su genoma haciendo un doble cruzamiento, mientras que las demás cepas/colonias se obtuvieron después de un solo cruzamiento, manteniendo los genes PS B y LPS intactos y expresados.

Utilizando ELISA de células enteras, los resultados (Figura 2 y Tabla a continuación) indican claramente que los dos transformantes "D" y "R" (derivados de las colonias D y R) ya no pueden ser reconocidos por los Mab PS anti-B (735 y 95/750), ni por los Mab anti-Los 3,7,9 ni anti-Los 8. Sin embargo, al utilizar Mab anti-PorA específicos, existe una clara reacción

32

con los Mab anti-P1 7 y anti-P1 16 de las células, como se observa tambien en la cepa de tipo silvestre No se observó reaccion con un Mab anti-PorA no especifico (mab anti-P1 2) Estos resultados confirman que la proteina PorA, y
 5 especificamente los epitopos P1 7 y P1 16 siguen estando presentes despues de la transformacion, mientras que el polisacárido B y los epitopos Los 3,7,9 y Los 8 (LPS) no lo estan

10

15

Tabla Especificidades de los anticuerpos monoclonales ensayados

Mab ensayados	Dirigidos contra	Resultado
PS 735 anti-B	polisacárido B	++ en la cepa de tipo silvestre (-) en los mutantes "D" y "R"
OS 95/750 de NIBSC anti-B	PS B	++ en la cepa de tipo silvestre (-) en los mutantes "D" y "R"

anti-P1 7 (NIBSC)	Bucle 1 de la porina A	++ en todas las cepas de tipo silvestre y mutantes
anti-P1 16 (NIBSC)	Bucle 4 de la porina A	++ en todas las cepas de tipo silvestre y mutantes
anti-Los 3,7,9	LPS	++ en la cepa de tipo silvestre (-) en los mutantes "D" y "R"
anti-Los 8 (NIBSC)	LPS	+/- en la cepa de tipo silvestre (-) en los mutantes "D" y "R"
anti-P1 2 (NIBSC)	serosubtipo 1 2 anti-porina A	(-) en todas las cepas de tipo silvestre y mutantes

Ejemplo 2 Construcción de vectores de introducción de genes versátiles (serie pCMK) dirigidos a la integración en el locus porA de *Neisseria meningitidis*

Se construyo un plasmido que permitia la recombinacion homologa y la integracion estable de DNA extraño en el locus PorA de *Neisseria meningitidis*. Este vector de suministro (de genes, operones y/o modulos de expresión) es util para la

25

construccion de cepas de *Neisseria meningitidis* que producen
ampollas mejoradas recombinantes. Tipicamente, dicho vector
contiene al menos (1) un esqueleto de plásmido replicativo en
E coli pero no en *Neisseria meningitidis* (plasmido suicida),
5 (2) al menos una, pero preferiblemente dos, regiones de
homologia para dirigir la integraci3n en un locus cromosomico
como *porA*, (3) se1ales transcripcionales (promotor, region
regulatoria y terminador) y de traduccion (sitios de union a
ribosomas y codon de iniciacion optimizados) eficaces y
10 funcionales en *Neisseria meningitidis*, (4) un sitio de clonacion
multiple y (5) gen(es) selectivo(s) que permita(n) el
mantenimiento del plásmido en *E coli* y la seleccion de
integrantes en *Neisseria meningitidis*. Los elementos adicionales
incluyen, por ejemplo, secuencias de incorporacion para
15 facilitar la entrada de DNA extraño en *Neisseria meningitidis* y
marcadores antiselectivos como *sacB*, *rpsL*, *gltS*, para aumentar
la frecuencia de los sucesos de doble cruzamiento.

Un dibujo esquemático del vector construido en este ejemplo
y designado como pCMK se representa en la Figura 3. Su secuencia
20 de nucleotidos completa correspondiente se muestra en SEC N°
ID 1. pCMK deriva de un esqueleto de pSL1180 (PharmaciaBiotech,
Suecia), un plasmido de alto numero de copias replicativo en *E
coli* que alberga el gen *bla* (y confiere de este modo resistencia
a la ampicilina). Adem1s de esto, pCMK contiene funcionalmente
25 dos regiones adyacentes a *porA* (*porA*5' y *porA*3', que contienen
un terminador de la transcripci3n) necesarias para la
recombinaci3n hom6loga, un marcador selectivo que confiere
resistencia a la canamicina, dos secuencias de incorporacion, un
promotor quimerico *porA/lacO* reprimido en el huesped *E coli* que

expresa *lacIq* pero transcripcionalmente activo en *Neisseria meningitidis*, y un sitio de clonación múltiple (5 sitios presentes *NdeI*, *KpnI*, *NheI*, *PstI* y *SphI*) necesarios para la inserción de DNA extraño en pCMK

- 5 pCMK se construyó como sigue Se amplificaron por PCR las regiones recombinogénicas *porA5'* y *porA3'* y el promotor *porA/lacO* utilizando los oligonucleótidos listados en la tabla siguiente, se clonaron en pTOPO y se secuenciaron Se extrajeron sucesivamente estos fragmentos de DNA de pTOPO y se reclonaron
- 10 en pSL1180 Se extrajo el módulo de resistencia a canamicina de pUC4K (PharmaciaBiotech, Suecia) y se introdujo entre la región adyacente *porA5'* y la región promotora *porA/lacO*

77

Tabla Oligonucleotidos utilizados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia	Observaciones
PorA5 Fwd	5 -CCC AAG CTT <u>GCC GTC TGA</u> ATA CAT CCC GTC ATT CCT CA-3	Sitio de clonación HindIII secuencia de incorporación()
PorA5 Rev	5 -CGA TGC TCG CGA CTC CAG AGA CCT CGT GCG GGC C-3	Sitio de clonación NruI
PorA3 Fwd	5 -GGA AGA TCT <u>GAT TAA ATA</u> GGC GAA AAT ACC AGC TAC GA-3	Sitio de clonación BglII Codones de terminación ()
PorA3 Rev	5 -GCC GAA TTC <u>TTC AGA CGG</u> CGC AGC AGG AAT TTA TCG G-3	Sitio de clonación EcoRI Secuencia de incorporación ()
PoLaRev1	5 -GAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TCC GGG CAA ACA CCC GAT AC-3	
PoLaRev2	5 -GAA TTC CAT ATG ATC GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA TAA AAA CCT AAA AAC ATC GAA TTG TTA TCC GCT C-3	Sitio de clonación NdeI
PorAlacO Fwd	5 -AAG CTC TGC AGG AGG TCT GCG CTT GAA TTG-3	Sitio de clonación de PstI
PorAlacO Rev	5 -CTT AAG GCA TAT GGG CTT CCT TTT GTA A-3	Sitio de clonación de NdeI
PPA1	5 -GCG GCC GTT GCC GAT GTC AGC C-3	
PPA2	5 -GGC ATA GCT GAT GCG TGG AAC TGC-3	
N-full-01	5 -GGG AAT TCC ATA TGA AAA AAG CAC TTG CCA CAC-3	Sitio de clonación NdeI
Nde-NspA-3	5 -GGA ATT CCA TAT GTC AGA ATT TGA CGC GCA-3	Sitio de clonación NdeI
PNS1	5 - CCG CGA ATT CGG AAC CGA ACA CGC CGT TCG-3	Sitio de clonación EcoRI
PNS1	5 -CGT CTA GAC GTA GCG GTA TCC GGC TGC- 3	Sitio de clonación XbaI
PromD15-51X	5 - GGG CGA ATT CGC GGC CGC CGT CAA CGG CAC ACC CGT TG-3	Sitios de clonación EcoRI y NotI
PromD15-S2	5 -GCT CTA GAG CGG AAT GCG GTT TCA GAC G-3	Sitio de clonación XbaI
PNS4	5 -AGC TTT ATT TAA ATC CTT AAT TAA CGC GTC CGG AAA ATA TGC TTA TC-3	Sitios de clonación SmaI y PacI
PNS5	5 -AGC TTT GTT TAA ACC CTG TTC CGC TGC TTC GGC-3	Sitio de clonación PmeI

D15-S4	5 -GTC CGC ATT TAA ATC CTT AAT TAA GCA GCC GGA CAG GGC GTG G-3	Sitios de clonación SmaI y PacI
D15-S5	5 -AGC TTT GTT TAA AGG ATC AGG GTG TGG TCG GGC-3	Sitio de clonación PmeI

Ejemplo 3 Construcción de una cepa de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de polisacáridos capsulares y del antígeno principal inmunodominante PorA

5

La modulación del contenido antigenico de las ampollas de membrana externa puede ser ventajoso para mejorar su seguridad y eficacia en su uso en vacunas, o usos de diagnóstico o terapéuticos. Componentes como los polisacaridos capsulares del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* deberian eliminarse para excluir el riesgo de inducir autoinmunidad (vease ejemplo 1). De manera similar, es beneficioso suprimir la inmunodominancia de los antigenos principales de membrana externa como PorA, que induce anticuerpos bactericidas especificos de cepa pero no confiere protección cruzada. Para ilustrar dicha aproximacion, la solicitante utilizó el vector pCMK(+) para construir una cepa de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de polisacáridos capsulares y del antígeno proteina de membrana externa PorA inmunodominante. Con este fin, se introdujo una supresion del gen PorA en la cepa H44/76 cps-, descrita en el ejemplo 1, por medio de recombinación homóloga.

Se preparó la cepa H44/76 cps- competente y transformada con 2 µg de DNA de plásmido pCMK(+) superenrrollado como se describio anteriormente. Se colocaron en placas Mueller-Hinton

suplementadas con canamicina (200 $\mu\text{g/ml}$) fracciones alícuotas de
 la mezcla de transformacion (100 μl) y se incubaron a 37°C
 durante de 24 a 48 horas Se seleccionaron la colonias
 resistentes a la canamicina, se resembraron en estrias en MH-Kn
 5 y se dejaron crecer durante otras 24 horas a 37°C En esta etapa
 se utilizo la mitad del cultivo bacteriano para preparar
 reservas de glicerol (15% vol/vol) y se mantuvo congelado a -
 70°C Se resuspendio otra fraccion (estimada en 10^8 bacterias) en
 15 μl de agua destilada, se hirvió durante 10 minutos y se
 10 utilizó como molde para el rastreo por PCR Se sintetizaron dos
 cebadores internos porA llamados PPA1 y PPA2 y se utilizaron
 para realizar una amplificacion por PCR sobre los lisados
 bacterianos hervidos en las condiciones descritas por el
 suministrador (HiFi DNA polymerase, Boehringer Mannheim, SL) El
 15 ciclo térmico utilizado fue el siguiente 25 veces (94°C, 1
 minuto, 52°C 1 minuto, 72°C, 3 minutos) y una vez (72°C, 10
 minutos, 4°C hasta recuperacion) Puesto que un doble
 cruzamiento entre el DNA de pCMK y el locus porA cromosomico
 suprime la región requerida para los acoplamientos #1 y #2, los
 20 clones exentos del fragmento de amplificacion PCR de 1170 pb se
 seleccionaron como mutantes de supresion porA Estos resultados
 de PCR se confirmaron después por analisis en paralelo de la
 presencia de PorA en los extractos de proteína bacteriana
 correspondientes Con este fin, se resuspendio otra alicuota de
 25 bacterias (estimada como 5×10^8 bacterias) en 50 μl de tampón
 PAGE-SDS (SDS al 5%, glicerol al 30%, beta-mercaptoetanol al
 15%, azul de bromofenol 0,3 mg/ml, Tris-HCl 250 mM, pH 6,8), se
 hirvió (100°C)-congeló (-20°C)-hirvió (100°C) tres veces y se

separo por electroforesis en PAGE-SDS en un gel al 12,5% Se
 tiñeron los geles con azul de Coomassie brillante R250 o se
 transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondaron con
 un anticuerpo monoclonal anti-PorA como se describe en Maniatis
 et al Como representa la Figura 4, tanto Coomassie como la
 inmunotransferencia confirmaron que los clones negativos PCR de
 PorA no producen niveles detectables de PorA Este resultado
 confirma que el vector pCMK es funcional y puede utilizarse para
 dirigir la insercion de DNA en el gen porA, cancelando
 concomitantemente la produccion del antígeno de proteina de
 membrana externa PorA

Ejemplo 4 Sobrerregulación de la produccion de la proteina de
 membrana externa NspA a partir de una cepa de serogrupo B de
 Neisseria meningitidis recombinante exenta de los genes
 funcionales porA y cps

El enriquecimiento de las vesiculas de ampollas en
 antigenos protectores es ventajoso para mejorar la eficacia y la
 cobertura de las vacunas basadas en proteinas de membrana
 externa En este contexto, las cepas de *Neisseria meningitidis*
 recombinante exentas de los genes cps y porA funcionales se
 modificaron de manera que el nivel de expresion de la proteina
 de membrana externa NspA estaba sobrerregulado Con este fin, el
 gen que codificaba la NspA se amplifico por PCR utilizando los
 cebadores oligonucleotidos N01-full-NdeI y NdeI-3' (vease la
 tabla del ejemplo 2) Las condiciones utilizadas por la
 amplificacion de PCR fueron las descritas por el suministrador
 (HiFi DNA polymerase, Boehringer Mannheim, SL) El ciclo termico

41

realizado fue el siguiente 25 veces (94°C 1 minuto, 52°C, 1 minuto, 72°C, 3 minutos) y una vez (72°C, 10 minutos, 4°C hasta recuperacion) Se digirió el correspondiente amplicon con NdeI y se inserto en el sitio de restriccion de NdeI del vector de introduccion pCMK(+) Se comprobó la orientacion de la inserción y se purificaron los plásmidos recombinantes, designados por pCMK(+)-NspA, a gran escala utilizando el estuche de maxipreparación de QIAGEN y se utilizaron 2 µg de este material para transformar una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de los genes funcionales cps (cepa descrita en el ejemplo 1) La integraci3n resultante del doble cruzamiento entre el vector pCMK(+)-NspA y el locus cromosomico porA se selecciono utilizando la combinacion de procedimientos de rastreo de PCR y de transferencia Western presentados en el ejemplo 3

Se resuspendieron las bacterias (correspondientes a alrededor de 5×10^8 bacterias) en 50 µl de tamp3n PAGE-SDS, se congelaron (-20°C)/hirvieron (100°C) tres veces y despues se separaron por electroforesis PAGE-SDS en un gel al 12,5% Se tiñeron los geles con azul de Coomassie brillante R250 o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondaron con un suero policlonal anti-NspA Tanto las tinciones con Coomassie (datos no mostrados) como tincion por inmunotransferencia (véase la figura 4) confirmaron que los clones negativos PCR de porA no producen niveles detectables de PorA La expresion de NspA se examinó en lisados bacterianos de celulas enteras (WCBL) o preparaciones de ampollas de membrana externa derivadas de NmB [cps-, porA-] o NmB [cps-, porA-, Nspa+] Aunque no se observó diferencia por tinci3n con Coomassie, la inmunotransferencia con

82

el suero policlonal anti-NspA detecto un aumento de 3-5 veces en la expresión de NspA (con respecto al nivel de NspA endogeno), tanto en WCBL como en preparaciones de ampollas de membrana externa (vease figura 5) Este resultado confirma que el vector pCMK(+)-NspA es funcional y puede utilizarse con éxito para

5

Ejemplo 5 Sobrerregulacion del antígeno de proteína de membrana externa D15/Pme85 en ampollas derivadas de una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de genes cps funcionales pero que expresa PorA

10

Ciertas poblaciones humanas aisladas geograficamente (como Cuba) están infectadas por un numero limitado de aislados de *Neisseria meningitidis* que pertenecen mayoritariamente a uno o a pocos serotipos de proteína de membrana externa. Puesto que PorA es un antígeno de proteína de membrana externa mayoritario que induce anticuerpos bactericidas protectores y especificos de cepa, es posible conferir proteccion de vacuna utilizando un numero limitado de serotipos porA en una vacuna. En dicho contexto, la presencia de PorA en vesículas de membrana externa puede ser ventajosa, reforzando la eficacia de la vacuna de dichas ampollas mejoradas recombinantes. Sin embargo, dichas vacunas que contienen PorA pueden mejorarse aun mas aumentando el nivel de OMP de reaccion cruzada como omp85/D15

20

25

En el siguiente ejemplo se utilizó el vector pCMK(+) para sobrerregular la expresión del antígeno de proteína de membrana

CS

externa omp85/D15 en una cepa exenta de los genes funcionales cps pero que expresaba porA. Con este fin, se amplificó por PCR el gen que codificaba omp85/D15 utilizando los oligonucleótidos cebadores D15-NdeI y D15-NotI. Las condiciones utilizadas para la amplificación de PCR fueron las descritas por el proveedor (H1F1 DNA polymerase, Boehringer Mannheim, SL). El ciclo térmico realizado fue el siguiente: 25 veces (94°C, 1 minuto, 52°C 1 minuto, 72°C, 3 minutos) y una vez (72°C, 10 minutos, 4°C hasta recuperación). Se insertó el correspondiente amplicon en el vector de clonación pTOPO según las especificaciones del fabricante y se realizó una secuenciación confirmatoria. Se extrajo este fragmento de DNA Omp85/D15 de pTOPO por^A hidrólisis de restricción utilizando NdeI/NsiI y a continuación clonando en los sitios de restricción correspondientes del vector de suministro pCMK(+). Se purificaron los plásmidos recombinantes, designados como pCMK(+)-D15 a gran escala utilizando el estuche de maxipreparación de QIAGEN y se utilizaron 2 µg de este material para transformar una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de los genes funcionales cps (cepa descrita en el ejemplo 1). Para preservar la expresión de porA, la integración resultante de un cruzamiento simple (en pme85/D15 o en porA) se seleccionó mediante una combinación de procedimientos de rastreo de PCR y de transferencia Western. Los clones resistentes a la canamicina que dieron positivo por PCR específico de porA y transferencia Western se almacenaron a -70°C como reservas de glicerol y se utilizaron para otros estudios.

Se resuspendieron las bacterias (correspondientes a

48

alrededor de 5×10^8 bacterias) en 50 μ l de tampon PAGE-SDS, se congelaron (-20°C)/hirvieron (100°C) tres veces y despues se separaron por electroforesis PAGE-SDS en un gel al 12,5% Se tiñeron los geles con azul de Coomassie brillante R250 o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondaron con un anticuerpo monoclonal anti-porA Como representa la Figura 6, tanto las tinciones con Coomassie como la tincion por inmunotransferencia confirmaron que los clones positivos PCR de porA producen PorA

La expresion de D15 se examino utilizando preparaciones de ampollas de membrana externa derivadas de NmB [cps-, porA-] o NmB [cps-, porA+, D15+] Coomassie detecto un aumento significativo en la expresi3n de D15 (con respecto al nivel endogeno de D15), en las preparaciones (vease la Figura 6) Este resultado confirm3 que el vector pCMK(+)-D15 es funcional y puede utilizarse con exito para sobrerregular la expresion de las prote3nas de membrana externa como D15, sin cancelar la producci3n del antígeno de prote3na de membrana externa mayoritario PorA

Ejemplo 6 Construccion de vectores de introduccion de promotores versatiles

Fundamento El fundamento de esta aproximaci3n se representa en la Figura 7 y puede resumirse en 7 etapas esenciales Algunas de estas etapas estan ilustradas a continuaci3n con la construccion de un vector para la sobrerregulaci3n de la expresi3n de NspA y D15/Omp85

85

Vector para la sobrerregulacion de la expresion del gen NspA

Etapa 1 Se descubrió una región de DNA (997 pb) localizada
cadena arriba del gen de codificación de NspA (SEC N° ID 2) en
la base de datos privada Incyte Pathoseq que contiene secuencias
5 de DNA genómico sin finalizar de la cepa ATCC 13090 de *Neisseria*
meningitidis. Se diseñaron y sintetizaron dos oligonucleótidos
cebadores referidos como PNS1 y PNS2 (vease la tabla del Ejemplo
2) utilizando esta secuencia. Se utilizaron estos cebadores para
amplificación PCR utilizando DNA genómico extraído de la cepa
10 H44/76

Etapa 2 Se purificaron los correspondientes amplicones
utilizando el estuche Wizard PCR (Promega, EE UU) y se
sometieron a digestión con las enzimas de restricción EcoRI/XbaI
durante 24 horas utilizando las condiciones descritas por el
15 suministrador (Boehringer Mannheim, Alemania). Los fragmentos de
DNA correspondientes se purificaron por gel y se insertaron en
los sitios correspondientes del vector de clonación pUC18. **Etapa**

3 Se prepararon los plásmidos recombinantes a gran escala y se
utilizó una fracción alícuota como molde para la amplificación
por PCR inversa. Se realizó la PCR inversa utilizando los
20 oligonucleótidos PNS4 y PNS5 utilizando las siguientes
condiciones térmicas cíclicas: 25 veces (94°C, 1 minuto, 50°C, 1
minuto, 72°C, 3 minutos) y una vez (72°C, 10 minutos, 4°C hasta
recuperación). Se obtuvieron vectores pUC18 linealizados que
25 albergaban una supresión en la inserción de la región cadena
arriba de NspA.

Vector para la sobrerregulacion de la expresion del gen D15/omp85

Etapas 1 Se descubrió una region de DNA (1000 pb) localizada
 cadena arriba del gen de codificación de d15/omp85 (SEC N° ID 3)
 en la base de datos privada Incyte Pathoseq que contiene
 secuencias de DNA genómico sin finalizar de la cepa ATCC 13090
 5 de *Neisseria meningitidis* Se diseñaron y sintetizaron dos
 oligonucleótidos cebadores referidos como PromD15-51X y PromD15-
 S2 (véase la tabla del Ejemplo 2) utilizando esta secuencia Se
 utilizaron estos cebadores para la amplificación PCR utilizando
 DNA genómico extraído de la cepa H44/76 **Etapas** 2 Se purificaron
 10 los correspondientes amplicones utilizando el estuche Wizard PCR
 (Promega, EE UU) y se sometieron a digestión con las enzimas de
 restricción EcoRI/XbaI durante 24 horas en las condiciones
 descritas por el suministrador (Boehringer Mannheim, Alemania)
 Los fragmentos de DNA correspondientes se purificaron por gel y
 15 se insertaron en los sitios correspondientes del vector de
 clonación pUC18 **Etapas** 3 Se prepararon los plasmidos
 recombinantes a gran escala y se utilizó una fracción alicuota
 como molde para la amplificación por PCR inversa Se realizó la
 PCR inversa utilizando los oligonucleótidos D15-S4 y D15-S5
 20 utilizando las siguientes condiciones térmicas cíclicas 25
 veces (94°C, 1 minuto, 50°C, 1 minuto, 72°C, 3, minutos) y una
 vez (72°C, 10 minutos, 4°C hasta recuperación) Se obtuvieron
 vectores pUC18 linealizados que albergaban una supresión en la
 inserción de la region cadena arriba de D15/omp85

Ejemplo 7 Procedimientos de fermentación para la producción de
 ampollas recombinantes

Los ejemplos listados a continuación describen procedimientos

CS

para la produccion de ampollas recombinantes exentas de polisacaridos capsulares o PorA Dicho procedimiento puede utilizarse para un amplio intervalo de cepas de *Neisseria meningitidis* recombinante y puede adaptarse en un extenso
5 intervalo de escala

Medios de cultivo Se propagaron las cepas de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* en medios de cultivo solidos (FNE 004 AA, FNE 010 AA) o liquidos (FNE 008 AA) Estos nuevos medios para el
10 crecimiento de meningococos estan ventajosamente exentos de productos animales, y se consideran otro aspecto de la invencion

88

Componentes	FNE 004 AA	FNE 008 AA	FNE 010 AA
Agar	18 g/l	-	18 g/l
NaCl	6 g/l	6 g/l	6 g/l
Glutamato de sodio	-	1,52 g/l	-
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	2,2 g/l	2,2 g/l	2,2 g/l
KCl	0,09 g/l	0,09 g/l	0,09 g/l
NH ₄ Cl	1,25 g/l	1,25 g/l	1,25 g/l
Glucosa	5 g/l	20 g/l	5 g/l
Extracto de levadura UF	-	2,5 g/l	-
Peptona de soja	5 g/l	30 g/l	5 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,015 g/l	-	0,015 g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,6 g/l	0,6 g/l	0,6 g/l
Eritromicina	0,015 g/l	-	-
Canamicina	-	-	0,2 g/l

Cultivo en matraces de ampollas recombinantes cps- del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*

- Se realizo en dos etapas que comprendian un precultivo en medio solido, seguido de cultivo liquido **Precultivo solido** Se saco del congelador (-80°C) un vial de semillas, se descongelo a

89

temperatura ambiente y se cultivo en estrias 0,1 ml en una placa Petri que contenia 15 ml de FNE004AA (vease anteriormente) Se incubó la placa Petri a 37°C durante 18 ± 2 horas Se resuspendió el crecimiento superficial en 8 ml de FNE008AA (véase anteriormente) suplementado con 15 mg/l de eritromicina

Cultivo en matraz Se añadieron 2 ml de precultivo sólido resuspendido a un matraz de 2 litros que contenia 400 ml de FNE008AA suplementado con 15 mg/l de eritromicina Se coloco el matraz en un tablero de agitación (200 rpm) y se incubó a 37°C durante 16 ± 2 horas Se separaron las celulas del caldo de cultivo por centrifugacion de 5000 g a 4°C durante 15 minutos

Cultivo en modo de cargas de ampollas recombinantes cps- de serogrupo B de *Neisseria meningitidis*

Se realizo en tres etapas que comprendian un precultivo en medio solido, cultivo liquido y cultivo en modo de cargas

Precultivo solido Se sacó del congelador (-80°C) un vial de semillas, se descongeló a temperatura ambiente y se cultivó en estrias 0,1 ml en una placa Petri que contenia 15 ml de FNE004AA (vease anteriormente) Se incubó la placa Petri a 37°C durante 18 ± 2 horas Se resuspendió el crecimiento superficial en 8 ml de FNE008AA (véase anteriormente) suplementado con 15 mg/l de eritromicina

Cultivo liquido Se añadieron 2 ml de precultivo solido resuspendido a un matraz de 2 litros que contenia 400 ml de FNE008AA suplementado con 15 mg/l de eritromicina Se coloco el matraz en un tablero de agitacion (200 rpm) y se incubó a 37°C durante 16 ± 2 horas Se utilizo el contenido del matraz para inocular un fermentador de 20 l

Cultivo en modo de cargas en fermentador Se añadio el inóculo (400 ml) a un fermentador

preesterilizado de 20 l (volumen total) que contenia 10 l de FNE008AA suplementado con 15 mg/l de eritromicina Se ajusto el pH y se mantuvo a 7,0 por adición automatica de NaOH (25% p/v) y H₃PO₄ (25% v/v) Se reguló la temperatura a 37°C Se mantuvo la
5 tasa de aireación a 20 l de aire/minuto y se mantuvo la concentración de oxígeno a un 20% de saturacion por control de la velocidad de agitación Se mantuvo la sobrepresión en el fermentador a 300 g/cm² Después de 9 ± 1 horas el cultivo estaba en fase estacionaria Se separaron las celulas del caldo de
10 cultivo por centrifugacion a 5000 g a 4°C durante 15 minutos

Cultivo en matraz de ampollas recombinantes cps-, PorA- del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*

Se realizó en dos etapas que comprendian el precultivo en un
15 medio solido seguido de cultivo liquido **Precultivo solido** Se sacó del congelador (-80°C) un vial de semillas, se descongelo a temperatura ambiente y se cultivo en estrias 0,1 ml en una placa Petri que contenia 15 ml de FNE010AA (vease anteriormente) Se incubo la placa Petri a 37°C durante 18 ± 2 horas Se
20 resuspendió el crecimiento superficial en 8 ml de FNE008AA (véase anteriormente) suplementado con 200 mg/l de canamicina

Cultivo en matraz Se añadieron 2 ml de precultivo solido resuspendido a un matraz de 2 litros que contenia 400 ml de FNE008AA suplementado con 200 mg/l de canamicina Se colocó el
25 matraz en un tablero de agitacion (200 rpm) y se incubó a 37°C durante 16 ± 2 horas Se separaron las células del caldo de cultivo por centrifugacion de 5000 g a 4°C durante 15 minutos

Ejemplo 8 Aislamiento y purificación de ampollas de

meningococos desprovistas de polisacaridos capsulares

Se purificaron ampollas recombinantes como se describe anteriormente. Se suspendió la pasta celular (42 g) en 211 ml de tampon Tris HCl 0,1 M pH 8,6 que contenia EDTA 10 mM y desoxicolato de sodio al 0,5% (DOC). La proporción de tampom a biomasa era de 5/1 (v/p). Se extrajo la biomasa por agitacion magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugo el extracto total a 20 000 g durante 30 minutos a 4°C (13 000 rpm en un rotor JA-20, centrifuga Beckman J2-HS). Se desechó el sedimento. Se ultracentrifugo el sobrenadante a 125 000 g durante 2 horas a 4°C (40 000 rpm en un rotor 50 2T1, ultracentrifuga Beckman L8-70M) para concentrar las vesiculas. Se desechó el sobrenadante. Se suspendio el sedimento cuidadosamente en 25 ml de tampón Tris HCl 50 mM, pH 8,6 que contenia EDTA 2 mM, DOC al 1,2% y sucrosa al 20%. Después de una segunda etapa de ultracentrifugacion a 125 000 g durante 2 horas a 4°C, se suspendió cuidadosamente en 44 ml de sucrosa al 3% y se almacenó a 4°C. Todas las disoluciones utilizadas para la extracción y purificacion de ampollas contenian tiomersalato al 0,01%. Como se ilustra en la Figura 8, este procedimiento proporciona preparaciones de proteina altamente enriquecidas en proteínas de membrana externa como PorA y PorB.

25 Ejemplo 9 Identificacion de promotores bacterianos adecuados para la sobrerregulación de genes que codifican antigenos

El uso de elementos promotores bacterianos fuertes es esencial para obtener la sobrerregulación de los genes que codifican las proteínas de membrana externa. En este contexto,

la solicitante ha mostrado previamente que la sobrerregulación de los genes *nspA*, *hsf* y *omp85* de *Neisseria meningitidis* utilizando el promotor *porA* ha permitido aislar las ampollas recombinantes enriquecidas en las correspondientes proteínas NspA, Hsf y Omp85. Las alternativas al promotor *porA* pueden ser útiles para obtener distintos niveles de sobrerregulación, para superar la variación de fase de *porA* potencial y/o conseguir la expresión de genes condicional (promotores regulados por hierro). Aquí la solicitante describe un procedimiento que permite la identificación de un sitio de inicio transcripcional preciso de los elementos promotores fuertes, que probablemente confieran un alto nivel de expresión a la bacteria. Puesto que los elementos regulatorios promotores están comprendidos clásicamente en los 200 pb cadena arriba y 50 pb cadena abajo a partir del sitio +1 (Collado-Vides, J, Magasanik, B, Gralla, J D, 1991, *Microbiol Rev* 55(3) 371-94), el resultado de dicho experimento nos permite identificar los fragmentos de DNA de alrededor de 250 pb que llevan las actividades promotoras fuertes. Las proteínas de membrana externa mayoritarias, como PorA, PorB y Rmp de *Neisseria meningitidis*, P1, P2, P5 y P6 de *Haemophilus influenzae*, OmpCD, OmpE de *Moraxella catarrhalis*, así como algunas proteínas citoplasmáticas y/o reguladas por hierro de estas bacterias, poseen elementos promotores fuertes. Como validación de esta metodología similar, la solicitante ha mapeado el sitio de inicio transcripcional de los promotores *porA* y *porB* fuertes de *Neisseria meningitidis* utilizando la amplificación rápida de los elementos de cDNA (5'RACE).

Los principios de 5'RACE son los siguientes 1) extracción de RNA total utilizando el estuche "RNeasy" de QIAGEN

Q3

Eliminacion del DNA genómico por tratamiento con DNasa seguido de purificacion por QIAGEN, 2) transcripción inversa de mRNA con un cebador del extremo 3' especifico de porA (llamado porA3) Tamaño de cDNA esperado 307 n Eliminación de RNA por hidrólisis alcalian, 3) ligamiento de un oligoanclaje de DNA de cadena simple (llamado DT88) al extremo 3' del cDNA, utilizando la ligasa T4 de RNA Tamaño de producto esperado 335 n Amplificacion del cDNA ligado al anclaje utilizando una combinacion de PCR semianidado, 4) amplificación por PCR del cDNA ligado al anclaje utilizando un cebador de secuencia complementaria al anclaje como cebador del extremo 5' (llamado DT89) y un cebador del extremo 3' (llamado pl-2) que es interno al cebador porA3 RT del extremo 3' Tamaño esperado 292 pb, 5) amplificación por PCR de los productos de amplificacion de PCR anteriores utilizando DT89 como cebador 5' y pl-1 como cebador 3' (interno a pl-2) Tamaño de producto esperado 211 pb, y 6) secuenciacion con cebador pl-1 (el tamaño de los productos esperados puede calcularse porque el sitio de inicio de la transcripcion de porA es conocido 59 n antes del sitio de inicio de traduccion "ATG")

Procedimiento experimental

Se extrajo el RNA total de aproximadamente 10^9 células de la cepa cps- porA+ del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* Se realizo la extraccion de 1 ml de cultivo liquido a una densidad optica apropiada ($DO_{600} = 1$) por el estuche "RNeasy" de QIAGEN segun las instrucciones del fabricante Se elimino el DNA cromosómico por adición de 10 U de RNasa exenta de DNasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) a los 30 μ l de RNA eluido y se

94

incubo a 37°C durante 15 minutos. Se purifico el RNA exento de DNA con el mismo estuche QIAGEN segun las instrucciones

Se realizaron las reacciones de transcripción inversa utilizando el cebador porA3 y 200 U de transcriptasa inversa SUPERScript II (Life Technologies). Las reacciones de RT se realizaron en un volumen de 50 µl que contenia 5 µl dNTP 2 mM, 20 pmol de cebador porA3, 5 µl de tampón 10 x SUPERScript II, 9 µl de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de DTT 0,1 M, 40 U de inhibidor de la ribonucleasa recombinante y 1 µg de RNA total. Se engarzó paso a paso el cebador porA3 (70°C durante 2 minutos, 65°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 45°C durante 1 minuto) antes de añadir SUPERScript II. Se realizo la reacción de RT a 42°C durante 30 minutos, seguida de 5 ciclos (50°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto y 56°C durante 1 minuto) para desestabilizar la estructura secundaria del RNA. Se realizaron dos reacciones paralelas con la transcriptasa inversa omitida en una reaccion como control negativo.

Se eliminó el RNA por corte por hidrolisis alcalina con la adición de 1 µl de EDTA 0,5 M, seguido de 12,5 µl de NaOH 0,2 M antes de incubacion a 68°C durante 5 minutos. Se neutralizaron las reacciones por adición de 12,5 µl de Tris-HCl 1 M (pH 7,4) y se precipitaron por adición de 20 µg de glicogeno (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), 5 µl de acetato de sodio 3 M y 60 µl de isopropanol. Se resuspendieron ambas mezclas en 20 µl de TE 10.1 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, pH 8).

25

Se utilizo ligasa T4 de RNA para anclar un oligonucleótido de anclaje DT88 5'-fosforilado y 3'-bloqueado por ddCTP (vease la tabla siguiente) Se realizaron dos ligamientos paralelos durante la noche a temperatura ambiente conteniendo cada uno
5 1,3 μ l de tampón ligasa de RNA 10 x (Roche Molecular Biochemicals), DT88 0,4 μ M, 10 μ l de cDNA o de una muestra de control RT y 3 U de ligasa T4 de RNA Como controles negativos se realizaron un segundo conjunto de reacciones de ligamiento, omitiendo la ligasa T4 de RNA Las mezclas de reacción-
10 ligamiento resultantes se utilizaron directamente sin purificacion en la siguiente PCR

Se amplifico el cDNA ligado al anclaje utilizando una combinación de aproximaciones de PCR semianidado e iniciado en caliente para aumentar la especificidad y el rendimiento del
15 producto Se realizaron cuatro PCR de primera ronda por separado en la reaccion de ligasa/RT y controles en un volumen de 30 μ l, conteniendo cada uno 3 μ l de tampon Taq Platinum 10 x, 3 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ l de dNTP 10 mM, 10 pmol de cada cebador y 1 μ l de la correspondiente reacción de ligamiento de RNA Se inicio
20 el PCR en caliente por el uso de DNA polimerasa Taq Platinum (Life Technologies) (2 U añadidas) Se realizó la primera PCR de ligamiento al anclaje (LA-PCR) utilizando 10 pmol del cebador especifico del anclaje DT89 y del cebador pl-2 especifico del transcripto (vease la tabla siguiente) que es interno al cebador
25 porA3 RT del extremo 3' Se realizó la PCR utilizando inicialmente una etapa de 95°C durante 5 minutos (para la activacion de la DNA polimerasa) seguida de 10 ciclos a 95°C durante 10 segundos y 70°C durante 1 minuto (reducción de 1

grado por ciclo), 15 ciclos a 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 1 minuto. Se realizó la segunda LA-PCR semianidada en las mismas condiciones utilizando el cebador DT89 y el cebador interno p1-2, junto con 10 pmol de p1-1 (véase la tabla siguiente) y 1 µl de PCR de la primera ronda. Los productos de amplificación se purificaron utilizando el estuche "QIAquick PCR purification" de QIAGEN según las instrucciones del fabricante antes de someter a secuenciación.

Se utilizó el estuche "CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing" (Beckman, Francia) para secuenciar los productos de RACE PCR utilizando 10 pmol del cebador p1-1. Las reacciones de secuenciación se realizaron según las instrucciones proporcionadas y los productos de secuenciación se analizaron por el sistema de análisis Ceq2000 DNA (Beckman-Coulter).

DT88	5' GAAGAGAAGGTGGAAATGGCGTTTGGC 3'
DT89	5' CCAAAACGCCATTTCACCTTCTCTTC 3'
porA3	5' CCAAATCCTCGCTCCCCTTAAAGCC 3'
p1-2	CGCTGATTTTCGTCCTGATGCGGGC 3'
p1-1	5' GGTCAATTGCGCCTGGATGTTCCCTG 3'

Resultados para el promotor porA de *Neisseria meningitidis*

Se mapeó el inicio de transcripción del mRNA de porA del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (cepa H44/76) 59 pb cadena arriba del codón ATG de inicio utilizando el procedimiento 5'-RACE descrito. Este resultado confirma el mapeo realizado por extensión de cebador y publicado por van der Ende et al (1995).

Este resultado apoya que un fragmento de DNA que contiene los nucleótidos -9 a -259, con respecto al ATG de porA, es adecuado para dirigir la expresión génica fuerte en *Neisseria meningitidis* y posiblemente en otras especies bacterianas como

5 *Haemophilus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*

Resultados para el promotor porB de *Neisseria meningitidis*

Se ha aplicado la misma estrategia experimental para el mapeo del inicio de transcripción del mRNA de porB del serogrupo

10 B de *Neisseria meningitidis* (cepa H44/76) Los cebadores listados en la tabla siguiente corresponden al cebador RT del extremo 3' (porB3), al cebador específico de transcripto que es interno en porB3 (porB2) y al interno en porB2 (porB1) porB3, porB2 y porB1 están respectivamente localizados a 256 pb, 195 pb

15 y 150 pb cadena abajo del codón de inicio ATG

porB1	5' GGTAGCGGTTGTAACCTCAGTAACCTT 3'
porB2	5' GTCTTCTTGGCCCTTTGAAGCCGATT 3'
porB3	5' GGAGTCAGTACCGGCGATAGATGCT 3'

Utilizando los cebadores porB1 y DT89, se obtuvo un amplicón por PCR de alrededor de 200 pb realizando el mapeo 5'-RACE Puesto que porB1 está localizado a 150 pb del codón de

20 inicio ATG de porB, este resultado apoya que el sitio de inicio transcripcional de porB está localizado alrededor de 50 pb ($\pm$ 30 pb) cadena arriba del ATG de porB

El nucleótido exacto correspondiente a la iniciación de la transcripción se determina por secuenciación de DNA Los

25 resultados de PCR anteriores apoyan que un fragmento de DNA que

94

contiene los nucleótidos -1 a -250 con respecto al codón de inicio ATG de porB es adecuado para dirigir la expresión genica fuerte en *Neisseria meningitidis* y posiblemente en otras especies bacterianas como *Haemophilus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*

5

Ejemplo 10 Sobrerregulación del gen Omp85 del serogrupo B de *N meningitidis* por reemplazamiento de promotor

El objetivo del experimento era reemplazar la region promotora endógena del gen D15/Omp85 por el promotor fuerte porA para sobrerregular la producción del antígeno D15/Omp85. Con este fin, se construyo un plasmido de reemplazamiento de promotor utilizando metodologias de clonacion de *E. coli*. Se descubrio una región de DNA (1000 pb) localizada cadena arriba del gen de codificación de D15/omp85 (SEC N°ID 3) en la base de datos privada Incyte Pathoseq que contiene secuencias de DNA genómico sin finalizar de la cepa ATCC 13090 de *Neisseria meningitidis*. Las etapas principales de este procedimiento se representan en la Figura 9. Resumiendo, se amplifico por PCR un fragmento de DNA (1000 pb) que comprende los nucleotidos -48 a -983 con respecto al codón de inicio (ATG) del gen D15/Omp85, utilizando los oligonucleótidos **ProD15-51X** (5'-GGG CGA ATT CGC GGC CGC CGT CAA CGG CAC ACC GTT G-3') y **ProD15-52** (5'-GCT CTA GAG CGG AAT GCG GTT TCA GAC G-3') que contienen sitios de restriccion de EcoRI y XbaI (subrayados) respectivamente. Este fragmento se sometio a restriccion y se insertó en un plásmido pUC18 restringido con las mismas enzimas. La construcción obtenida se sometio a mutagenesis in vitro utilizando el sistema Genome Priming (utilizando el plasmido donante pGPS2) comercializado por New England Biolabs (MA,

99

EE UU) Se seleccionaron los clones con una inserción de un minitransposon (derivado de Tn7 y que alberga un gen de resistencia a cloramfenicol) Se aislo un clon que contenia un minitransposon insertado en la region adyacente 5' D15/Omp85, 401 pb cadena abajo del sitio EcoRI y se utilizo para otros estudios Este plasmido se sometió a mutagenesis circular de PCR (Jones & Winistofer (1992), Biotechniques 12 528-534) para (i) suprimir una secuencia de DNA repetida (Tn7R) generada por el proceso de transposición, (ii) insertar secuencias de incorporacion meningococicas necesarias para la transformacion y (iii) insertar sitios de restriccion adecuados que permitan la clonacion de material de DNA extraño, como promotores La PCR circular se realizo utilizando los oligonucleótidos **TnRd15-KpnI/XbaI + US** (5'- CGC CGG TAC CTC TAG AGC CGT CTG AAC CAC TCG TGG ACA ACC C-3') y **TnR03Cam(KpnI)** (5'-CGC CGG TAC CGC CGC TAA CTA TAA CGG TC-3') que contienen secuencias de incorporacion y sitios de restriccion adecuados (KpnI y XbaI) subrayados El fragmento de PCR resultante se purificó sobre gel, se digirio con Asp718 (isosquizomero de KpnI) y se ligo a un fragmento de DNA de 184 pb que contenia el promotor porA y se genero por PCR utilizando los oligonucleotidos **PorA-01** (5'-CGC CGG TAC CGA GGT CTG CGC TTG AAT TGT G-3') y **PorA02** (5'-CGC CGG TAC CTC TAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') que contienen sitios de restricción KpnI Se seleccionaron los clones recombinantes que llevan un promotor porA insertado en la orientacion correcta (procedimiento de transcripcion en la direccion EcoRI a XbaI) y se utilizaron para transformar una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de polisacáridos capsulares (cps-) y de una de las proteinas mayoritarias de membrana externa, PorA

(porA-) Los clones de *Neisseria meningitidis* recombinante resultantes de un suceso de doble cruzamiento (rastreo por PCR utilizando los oligonucleotidos **Cam-05** (5'-GTA CTG CGA TGA GTG GCA GG-3') y **proD15-52**) se seleccionaron en medio GC que
5 contenia 5 µg/ml de cloramfenicol y se analizo la expresion de D15/Omp85 Como representa la Figura 10, la produccion de D15/Omp85 aumentó significativamente en los extractos de proteina total de las cepas Nm resultantes del reemplazamiento del promotor, comparadas con la cepa progenitora (cps-) Este
10 resultado se observó también al analizar ampollas de membrana externa preparadas a partir de las mismas cepas (vease la Figura 17) Estos resultados son atribuibles al reemplazamiento del promotor endogeno D15 por el promotor fuerte porA Ademas, se ha encontrado sorprendentemente que, cuando el promotor porA se
15 introdujo aproximadamente 400 pb cadena arriba del codon de iniciacion, la expresion era aproximadamente 50 veecs mayor que cuando el promotor se colocaba aproximadamente 100 pb cadena arriba En conjunto, estos experimentos apoyan que la estrategia de reemplazamiento funciona y permite la sobrerregulación de la
20 sintesis de las proteinas de membrana externa integrales en ampollas de membrana externa

Ciertas poblaciones humanas aisladas geográficamente (como Cuba) están infectadas por un numero limitado de aislados de
25 *Neisseria meningitidis* que pertenecen mayoritariamente a uno o a pocos serotipos de proteina de membrana externa Puesto que PorA es un antígeno de proteina de membrana externa mayoritario que induce anticuerpos bactericidas protectores y especificos de cepa, puede ser posible conferir protección de vacuna en dicha

poblacion utilizando un numero limitado de serotipos porA
Ademas, PorA pueden interaccionar con o estabilizar otras
proteinas de membrana externa En este contexto, la presencia de
PorA en vesiculas de membrana externa puede ser ventajosa,
5 reforzando la eficacia de la vacuna de dichas ampollas mejoradas
recombinantes

Por dicha razón, puede ser deseable sobrerregular la
expresion de la proteina de membrana externa D15/Omp85 en una
cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de genes
10 cps funcionales pero que exprese PorA Se extrajo DNA genómico
de la cepa cps-, porA-, D15/Omp85+ del serogrupo B de *Neisseria*
meningitidis recombinante utilizando el estuche Genomic Tips
100-G de QIAGEN Se linealizaron 10 µg de este material y se
utilizaron para transformar cps- de serogrupo B de *Neisseria*
15 *meningitidis* siguiendo un protocolo de transformación clasico
Se obtuvieron *Neisseria* recombinantes sobre placas de agar GC
que contenian 5 µg/ml de cloramfenicol

Las integraciones resultantes de un doble cruzamiento
cadena arriba del gen D15 se rastrearon por PCR como se
20 describió anteriormente Como las recombinaciones homologas
pueden suceder en cualquier lugar del cromosoma, se realizó un
segundo rastreo PCR para controlar la integridad del locus porA
en la cepa recombinante Con este fin se utilizaron los
cebadores internos de porA **PPA1** (5'-GCG GCC GTT GCC GAT GTC AGC
25 C-3') y **PpA2** (5'-GGC ATA GCT GAT GCG TGG AAC TGC-3') en un
experimento de rastreo por PCR La amplificacion de un fragmento
de 1170 pb confirmo la presencia del gen porA en las bacterias
recombinantes

Las bacterias recombinantes (correspondientes a alrededor

de 5×10^8 bacterias) pueden resuspenderse en 50 μ l de tampon PAGE-SDS, congelarse (-20°C)/hervirse (100°C) tres veces y despues separarse por electroforesis PAGE-SDS en gel de 12,5% Los geles pueden entonces teñirse con azul de Coomassie
5 brillante R250 o transferirse a una membrana de nitrocelulosa y sondearse con un anticuerpo monoclonal anti-porA o con un anticuerpo policlonal de conejo anti-D15/Omp85 Tambien puede realizarse el analisis de las ampollas de membrana externa preparadas a partir de las misma cepas

10

Ejemplo 11 Sobrerregulación del antígeno de proteina Hsf en una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* exenta de genes cps funcionales pero que expresa PorA

Como se describió anteriormente, en ciertos paises, la
15 presencia de PorA en vesiculas de membrana externa puede ser ventajosa, y puede reforzar la eficacia de la vacuna de ampollas mejoradas recombinantes En el siguiente ejemplo, la solicitante ha utilizado un vector pCMK(+) modificado para sobrerregular la expresion del antígeno de proteina Hsf en una cepa exenta de
20 genes cps funcionales pero que expresa PorA El vector pCMK(+) original contiene un promotor porA/lacO reprimido en el huesped *E coli* que expresa lacIq, pero transcripcionalmente activo en *Neisseria meningitidis* En el pCMK(+) modificado, el promotor nativo porA se utilizo para dirigir la transcripcion del gen
25 hsf El gen que codifica Hsf se amplifico por PCR utilizando los oligonucleótidos cebadores HSF 01-NdeI y HSF 02-NheI, presentados en la tabla siguiente Debido a la secuencia del cebador HSF 01-NdeI, la proteina Hsf expresada contendra dos residuos de metionina en el extremo 5' Las condiciones

utilizadas para la amplificación por PCR son las descritas por el suministrador (H1F1 DNA polymerase, Boehringer Mannheim, SL) El ciclo termico fue el siguiente 25 veces (94°C, 1 minuto, 48°C, 1 minuto, 72°C 3 minutos) y una vez (72°C, 10 minutos, 4°C hasta recuperación) Se clono a continuación el correspondiente amplicón en los correspondientes sitios de restricción del vector de introducción pCMK(+) En este plasmido recombinante, designado como pCMK(+)-Hsf, la solicitante suprimió el lacO presente en el promotor quimerico porA/lacO mediante una estrategia de PCR recombinante (vease la Figura 12) Se utilizo el plásmido pCMK(+)-Hsf como molde para amplificar por PCR 2 fragmentos separados de DNA

-fragmento 1 contiene la región recombinogenica porA 5', el gen de resistencia a la canamicina y el promotor porA Los oligonucleotidos cebadores utilizados, RP1 (SacII) y RP2, se presentan en la tabla siguiente El cebador RP1 es homólogo de secuencia con la secuencia cadena arriba del operador lac

-fragmento 2 contiene la secuencia de Shine-Dalgarno del gen porA, el gen hsf y la región recombinogenica porA 3' Los oligonucleótidos cebadores utilizados, RP3 y RP4 (ApaI) se presentan en la tabla siguiente El cebador RP3 es homologo con la secuencia cadena abajo del operador lac El extremo 3' del fragmento 1 y el extremo 5' del fragmento 2 tienen 48 bases superpuestas Se utilizaron 500 ng de cada PCR (1 y 2) para una reacción PCR final que utiliza los cebadores RP1 y RP4 El amplicón final obtenido se subclono en el vector pSL1180 restringido con SacII y ApaI Se purificó el plasmido modificado

pCMK(+)-Hsf a gran escala utilizando el estuche de

maxipreparación QIAGEN y se utilizaron 2 µg de este material para transformar una cepa de serotipo B de *Neisseria meningitidis* exenta de genes cps funcionales (la cepa descrita en el ejemplo 1) Para preservar la expresión de porA, se selecciono la integracion resultante de un cruzamiento simple por combinacion de procedimientos de rastreo de PCR y transferencia Western Los clones resistentes a la canamicina que dieron positivo por PCR específico de porA y transferencia Western se almacenaron a -70°C como reservas de glicerol y se utilizaron para otros estudios Se resuspendieron las bacterias (correspondientes a alrededor de 5 x 10⁸ bacterias) en 50 µl de tampón PAGE-SDS, se congelaron (-20°C)/hirvieron (100°C) tres veces y despues se separaron por electroforesis PAGE-SDS en un gel al 12,5% Se examino la expresion de Hsf en lisados bacterianos de celulas enteras (WCBL) derivados de NmB [Cps-, PorA+] o NmB [Cps-, PorA+, Hsf+] La tincion con Coomassie detectó un aumento significativo de la expresión de Hsf (con respecto al nivel de Hsf endogeno) (vease la Figura 13) Este resultado confirma que el vector modificado pCMK(+)-Hsf es funcional y puede utilizarse con éxito para sobrerregular la expresión de las proteínas de la membrana externa, sin cancelar la produccion del antígeno de proteina de membrana externa mayoritario PorA

25 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Oligonucleotí- dos	Secuencia	Observaciones

Hsf-NdeI	5'-CGA ATT CCA TAT GAT GAA CAA AAT ATA CCG C- 3'	Sitio de clonacion NdeI
Hsf 02-Nhe	5'-GTA GCT AGC TAG CTT ACC ACT GAT AAC CGA C- 3'	Sitio de clonacion NheI
GFP-mut-Asn	5'-AAC TGC AGA ATT ATT ATG AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3'	Sitio de clonacion AsnI Compatible con NdeI
GFP-Spe	5'-GAC ATA CTA GTT TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG-3'	Sitio de clonacion SpeI Compatible con NheI
RP1 (SacII)	5'-TCC CCG CGG GCC GTC TGA ATA CAT CCC GTC-3'	Sitio de clonacion SacII
RP2	5'-CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG TCT TCA-3'	
RP3	5'-AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC TCA AAT TTA CAA AAG GAA GCC CAT ATG-3'	
RP4 (ApaI)	5'-GGG TAT TCC GGG CCC TTC AGA CGG CGC AGC AGG-3'	Sitio de clonacion ApaI

Ejemplo 12 Expresión de proteína fluorescente verde en una cepa de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* recombinante exenta de genes cps funcionales pero que expresa PorA

5 En el siguiente ejemplo se utilizó el vector pCMK para ensayar la expresión de una proteína heteróloga citoplásmica en *Neisseria meningitidis*. Se amplificó la proteína fluorescente verde a partir del plásmido pKen-Gfpmut2 con los cebadores GFP-Ans-mut y GFP-Spe (véase la tabla del Ejemplo 11). AsnI
10 proporciona extremos cohesivos compatibles con NdeI, SpeI proporciona extremos cohesivos compatibles con NheI. Las condiciones utilizadas para la amplificación por PCR fueron las descritas por el suministrador (HiFi DNA polymerase, Boehringer Mannheim, SL). El ciclo térmico fue el siguiente: 25 veces
15 (94°C, 1 minuto, 48°C, 1 minuto, 72°C, 3 minutos) y 1 vez (72°C, 10 minutos, 4°C hasta recuperación). Se clonó a continuación el correspondiente amplicón en el vector de suministro pCMK(+) digerido con las enzimas de restricción NdeI y NheI. En este plásmido recombinante, designado como pCMK(+)-GFP, la
20 solicitante suprimió el lacO presente en el promotor quimérico porA/lacO por estrategia PCR recombinante. Se utilizó el plásmido pCMK(+)-GFP como molde para amplificar por PCR dos fragmentos separados de DNA.

-fragmento 1 contenía la región recombinogénica porA 5', el
25 gen de resistencia a la canamicina y el promotor porA. Oligonucleótidos cebadores utilizados: RP1 (SacII) y RP2 (véase la tabla del Ejemplo 11). El cebador RP1 es homólogo con la secuencia cadena arriba del operador lac.

-fragmento 2 contiene la secuencia de Shine-Dalgarno, el

gen gfp y la region recombinogenica porA 3' Los oligonucleotidos cebadores utilizados RP3 y RP4 (ApaI) estan presentes en la tabla del ejemplo 11 El cebador RP3 es homologa con la secuencia cadena abajo del operador lac

5 El fragmento 3' terminal del fragmento 1 y el 5' terminal del fragmento 2 tienen 48 bases superpuestas Se utilizaron 500 ng de cada PCR (1 y 2) para una reacci3n PCR final que utilizaba RP1 y RP4 20 µg de este fragmento de PCR se utilizaron para transformar una cepa de serogrupo B de *Neisseria meningitidis*
10 exenta de genes cps funcionales

La transformacion con DNA lineal es menos eficiente que con DNA de plasmido circular, pero todos los recombinantes obtenidos realizaron un doble cruzamiento (confirmado por una combinaci3n de procedimientos de rastreo PCR y transferencia Western) Se
15 almacenaron los clones resistentes a canamicina a -70°C como reservas de glicerol y se utilizaron para otros estudios Se resuspendieron las bacterias (correspondientes a alrededor de 5×10^8 bacterias) en 50 µl de tampon PAGE-SDS, se congelaron (-20°C)/hirvieron (100°C) tres veces y despu3s se separaron por
20 electroforesis PAGE-SDS en gel al 12.5%

Se examino la expresion de GFP en lisados de celulas enteras (WCBL) derivados de NmB [Cps-, PorA+] o NmB [Cps-, PorA-, GFP+] La tinci3n por Coomassie detect3 una expresion de GFP ausente en la cepa receptora de *Neisseria meningitidis* (vease la
25 figura 14)

Ejemplo 13 Sobrerregulaci3n del gen NspA del serogrupo B de *N. meningitidis* por reemplazamiento de promotor

El objetivo del experimento era reemplazar la regi3n

promotora del gen NspA por un promotor porA fuerte para
 sobrerregular la produccion de antígeno de NspA. Con este fin,
 se construyo un plasmido de reemplazamiento utilizando
 metodologias de clonacion de *E. coli*. Se descubrio una region de
 5 DNA (924 pb) localizada cadena arriba del gen de codificacion de
 NspA (SEC N° ID 7) en la base de datos privada Incyte Pathoseq
 que contiene secuencias de DNA genómico sin finalizar de la cepa
 ATCC 13090 de *Neisseria meningitidis*. Se amplifico por PCR un
 fragmento de DNA (675 pb) que cubria los nucleotidos -115 a -790
 10 con respecto al codón de inicio del gen NspA (ATG) utilizando
 los oligonucleotidos **PNS1'** (5'-CCG CGA ATT CGA CGA AGC CGC CCT
 CGA C-3') y **PNS2** (5'-CGT CTA GAC GTA GCG GTA TCC GGC TGC-3') que
 contenian sitios de restriccion EcoRI y XbaI (subrayados)
 respectivamente. Se sometio el fragmento PCR a restriccion con
 15 EcoRI y XbaI y se insertó en pUC18. Se sometio este plásmido a
 mutagénesis de PCR circular (Jones & Winistofer (1992),
 Biotechniques 12 528-534) para insertar secuencias de
 incorporacion meningococicas necesarias para la transformacion,
 y sitios de restriccion adecuados que permitan la clonación de
 20 un módulo promotor Cmr/PorA. La PCR circular se realizo
 utilizando los oligonucleótidos **BAD01-2** (5'-GGC GCC CGG GCT CGA
GCT TAT CGA TGG AAA ACG CAG C-3') y **BAD02-2** (5'-GGC GCC CGG GCT
CGA GTT CAG ACG GCG CGC TTA TAT AGT GGA TTA AC-3') que contenian
 secuencias de incorporación y sitios de restriccion adecuados
 25 (XmaI y XhoI) subrayados. El fragmento de PCR resultante se
 purificó por gel y se digirió con XhoI. Se amplifico el módulo
 promotor Cmr/PorA a partir del plásmido pUC D15/Omp85
 anteriormente descrito utilizando los oligonucleótidos cebadores
BAD 15-2 (5'-GGC GCC CGG GCT CGA GTC TAG ACA TCG GGC AAA CAC

CCG-3') y **BAD 03-2** (5'-GGC GCC CGG GCT CGA GCA CTA GTA TTA CCC
 TGT TAT CCC-3') que contenian sitios de restriccion adecuados
 (XmaI, XbaI, SpeI y XhoI) subrayados El fragmento PCR obtenido
 se sometio a digestión y se insertó en el plásmido de PCR
 5 circular restringido con las correspondientes enzimas Se
 linealizaron 10 µg del plasmido rescombinante y se utilizaron
 para transformar una cepa de serogrupo B de *Neisseria*
meningitidis exenta de polisacaridos capsulares (cps-) y de una
 de las proteínas de membrana externa mayoritarias, PorA (porA-)
 10 Se seleccionaron los clones recombinantes de *Neisseria*
meningitidis resultado de un suceso de doble cruzamiento
 (rastreo por PCR utilizando los oligonucleotidos **BAD 25** (5'-GAG
 CGA AGC CGT CGA ACG C-3') y **BAD08** (5'-CTT AAG CGT CGG ACA TTT
 CC-3') sobre placas de agar GC que contenian 5 µg/ml de
 15 cloramfenicol y se analizó las expresión de NspA Se
 resuspendieron las bacterias recombinantes (correspondientes a
 alrededor de 5×10^8 bacterias) en 50 µl de tampon PAGE-SDS, se
 congelaron (-20°C)/hirvieron (100°C) tres veces y despues se
 separaron por electroforesis PAGE-SDS en un gel al 12,5% Se
 20 tiñeron los geles con azul de Coomasie brillante R250 o se
 transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondearon con
 un anticuerpo monoclonal PorA o con un anticuerpo policlonal
 anti-NspA (figura 17) Como para Omp85, existe una sorprendente
 indicacion de que las insercion del promotor aproximadamente 400
 25 pb cadena arriba del codon de iniciacion de NspA expresa mas
 proteina que si se coloca aproximadamente 100 pb cadena arriba

Puede utilizarse el mismo plasmido recombinante pUC para
 sobrerregular la expresion de NspA en una cepa del serogrupo B

de *Neisseria meningitidis* exenta del gen cps funcional pero que expresa PorA

Ejemplo 14 Sobrerregulación del gen pldA (omplA) del serogrupo B de *N meningitidis* por reemplazamiento de promotor

El objetivo del experimento era reemplazar la region promotora endógena del gen pldA (omplA) por el promotor fuerte porA para sobrerregular la producción del antígeno PldA (OmpA1) Con este fin, se construyó un plásmido de reemplazamiento de promotor utilizando metodologias de clonacion de *E coli*. Se descubrio una región de DNA (373 pb) localizada cadena arriba de la secuencia de codificación de pldA (SEC N° ID 18) en la base de datos privada Incyte Pathoseq que contiene secuencias de DNA genómico sin finalizar de la cepa ATCC 13090 de *Neisseria meningitidis*. Este DNA contiene la secuencia que codifica un gen rpsT putativo. El codón de parada de rpsT esta localizado 169 pb cadena arriba del ATG de pldA. Para evitar la desestabilizacion de este gen potencialmente importante, la solicitante decidió insertar el módulo promotor CmR/PorA cadena arriba del ATG de pldA. Con este fin, se amplificó por PCR un fragmento de DNA de 992 pb correspondiente al gen rpsT, la secuencia intergénica de 69 pb y los primeros 499 nucleótidos del gen pldA de DNA genómico del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, utilizando los oligonucleótidos **PLA1 Amo5** (5'-GCC GTC TGA ATT TAA ATT TGC GCG TTT ACA G-3') y **PLA1 Amo3** (5'-GTA GTC TAG ATT CAG ACG GCG CAA TTT GGT TTC CGC AC-3') que contenian secuencias de incorporación (subrayadas). PLA1 Amo3 contiene tambien un sitio de restriccion de XbaI. Este fragmento de PCR se purificó con un estuche High Pure (Roche, Mannheim, Alemania) y se clono

111

directamente en un vector pGemT (Promega, EE UU) Se sometio este plasmido a mutagénesis de PCR circular (Jones & Winistofer (1992)) para insertar sitios de restriccion adecuados que permitan la clonacion de un módulo promotor CmR/PorA Se realizo

5 la PCR circular utilizando los oligonucleótidos **CIRC1-Bgl** (5'-CCT AGA TCT CTC CGC CCC CCA TTG TCG-3') o **CIRC1-XH-RBS/2** (5'-CCG CTC GAG TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGA ATA TAC GGA ATA TGA G-3') o **CIRC2-XHO/2** (5'-CCG CTC GAG ATG AAT ATA CGG AAT-3') que

10 contenian sitios de restriccion adecuados (BglII y XhoI) subrayados Se amplificó el modulo promotor CmR/PorA a partir del plasmido pUC D15/Omp85 descrito anteriormente utilizando los cebadores **BAD20** (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') y **CM-PORA-3** (5'-CCG CTC GAG ATA AAA ACC TAA AAA CAT CGG GC-3') que contenian sitios de restricción adecuados (BglII

15 y XhoI) subrayados Se clono este fragmento PCR en el plasmido de PCR circular obtenido con los cebadores CIRC1-Bgl y CIRC1-XH-RBS/2 Este plasmido puede utilizarse para transformar cepas (cps-) y (cps-, porA-) del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* La integración por doble cruzamiento en la region

20 cadena arriba de pldA dirigirá la inserción del promotor porA directamente cadena arriba del ATG de pldA Se amplifico otro módulo a partir del DNA genómico de (cps-, porA-, D15/Omp85+) del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* recombinante que sobreexpresa D15/Omp85 por reemplazamiento de promotor Este

25 módulo contiene el gen cmR, el promotor porA y 400 pb correspondientes a la secuencia adyacente 5' del gen D15/Omp85 Esta secuencia se ha probado que es eficaz para sobrerregular la expresión de D15/Pme85 en *Neisseria* y se ensayará para la sobrerregulación de la expresión de otros antígenos *Neisseria*

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron **BAD20** y **CM-PORA-D15/3** (5'-CGG CTC GAG TGT CAG TTC CTT GTG GTC C-3'), que contenían sitios de restricción XhoI (subrayado). Se clonó este fragmento PCR en el plásmido PCR circular obtenido con los
 5 cebadores CIRC-Bgl y CIRC2-XHO/2. Se utilizó este plásmido para transformar las cepas [cps-] y [cps-, porA-] del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. La integración por doble cruzamiento en la región cadena arriba de pldA dirigirá la inserción del promotor porA 400 pb cadena arriba del ATG de
 10 pldA.

Ejemplo 15 Sobrerregulación del gen tbpA del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* por reemplazamiento de promotor

El objetivo de este experimento era reemplazar la región
 15 promotora endógena del gen tbpA por el promotor fuerte porA para sobrerregular la producción del antígeno TbpA. Con este fin, se contruyó un plásmido de reemplazamiento de promotor utilizando metodologías de clonación de *E. coli*. Se descubrió una región de
 20 DNA (731 pb) localizada cadena arriba de la secuencia de codificación de tbpA (SEC N° ID 17) en la base de datos privada Incyte Pathoseq que contiene secuencias de DNA genómico sin finalizar de la cepa ATCC 13090 de *Neisseria meningitidis*. Este DNA contiene la secuencia que codifica el antígeno TbpB. Los genes están organizados en un operón. El gen tbpB será suprimido
 25 y reemplazado por el módulo promotor CmR/porA. Con este fin se amplificó por PCR un fragmento de DNA de 3218 pb correspondiente a la región de 509 pb 5' adyacentes al gen tbpB, la secuencia de codificación tbpB de 2139 pb, la secuencia intergénica de 87 pb y los 483 primeros nucleótidos de la secuencia de codificación.

de *tbpA* a partir de DNA genómico del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, utilizando los oligonucleotidos **BAD16** (5'-GGC CTA GCT AGC CGT CTG AAG CGA TTA GAG TTT CAA AAT TTA TTC-3') y **BAD17** (5'-GGC CAA GCT TCA GAC GGC GTT CGA CCG AGT AGT TTG AGC CTT TGC-3') que contenian secuencias de incorporación y sitios de restriccion *NheI* y *HindIII* (subrayados) Se purificó este fragmento PCR con un estuche High Pure (Boehringer Mannheim, Alemania) y se clonó directamente en un vector pGemT (Promega, EE UU) Se sometio este plasmido a mutagénesis PCR circular (Jones & Winistofer (1992)) para (i) insertar sitios de restricción adecuados que permitan la clonacion de un modulo promotor *CmR/PorA* y (ii) para suprimir 209 pb de la secuencia adyacente 5' de *tbpB* y la secuencia de codificación *tbpB* Se realizo la PCR circular utilizando los oligonucleotidos **BAD18** (5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') y **BAD19** (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G-3') que contenian sitios de restriccion adecuados *XmaI*, *BglII* y *XhoI* (subrayados) Se amplificó el modulo promotor *CmR/PorA* a partir del plasmido pUC D15/*Omp85* anteriormente descrito utilizando los cebadores **BAD21** (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') y **BAD20** (5'-TTC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') que contenian sitios de restricción adecuados *XmaI*, *SpeI*, *BglII* y *XhoI* (subrayados) Se clono este fragmento PCR en el plasmido de PCR circular Se utilizara este plasmido para transformar las cepas [cps-] y [cps-, porA-] del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* La integracion por doble cruzamiento en la region cadena arriba de *tbpA* dirigira la insercion del promotor *porA* directamente cadena arriba del ATG de *tbpA*

Ejemplo 16 Sobrerregulación del gen pilQ del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* por reemplazamiento de promotor

El objetivo del experimento era reemplazar la region
5 promotora endógena del gen pilQ por el promotor fuerte porA para
sobrerregular la produccion del antígeno PilQ. Con este fin, se
construyo un plásmido de reemplazamiento de promotor utilizando
metodologias de clonacion de *E. coli*. Se descubrio una región de
DNA (772 pb) localizada cadena arriba del gen que codifica pilQ
10 (SEC N° ID 12) en la base de datos privada Incyte Pathoseq que
contiene secuencias de DNA genómico sin finalizar de la cepa
ATCC 13090 de *Neisseria meningitidis*. Este DNA contiene la
secuencia que codifica un antígeno Pilp. El gen pilQ es parte de
un operón que no se desea dañar, por ser las pilinas elementos
15 esenciales de la bacteria. Se introdujo el modulo promotor
CmR/PorA cadena arriba del gen pilQ siguiendo la misma
estrategia descrita para la sobrerregulación de la expresion del
gen pldA. Con este fin, se amplificó por PCR un fragmento de DNA
de 866 pb correspondiente a la parte 3' de la secuencia de
20 codificación de pilP, la secuencia intergénica de 18 pb y los
primeros 392 nucleotidos del gen pilQ de DNA genómico del
serogrupo B de *Neisseria meningitidis* utilizando los
oligonucleótidos **PQ-rec5-Nhe** (5'-CTA GCT AGC GCC GTC TGA ACG ACG
CGA AGC CAA AGC-3') y **PQ-rec3-Hin** (5'-GCC AAG CTT TTC AGA CGG
25 CAC GGT ATC GTC CGA TTC G-3') que contenian secuencias de
incorporación y sitios de restriccion NheI y HindIII
(subrayados). Este fragmento de PCR se clono directamente en un
vector pGemT (Promega, EE UU). Se sometió este plasmido a
mutagenesis PCR circular (Jones & Winistofer (1992)) para

insertar sitios de restricción adecuados que permitan la clonación de un módulo promotor CmR/PorA. Se realizó la PCR circular utilizando los oligonucleótidos **CIRC1-PQ-Bgl** (5'-GGA AGA TCT AAT GGA GTA ATC CTC TTC TTA-3') o **CIRC1-PQ-Xho** (5'-CCG CTC GAG TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGA TTA CCA AAC TGA CAA AAA TC-3') o **CIRC2-PQ-X** (5'-CCG CTC GAG ATG AAT ACC AAA CTG ACA AAA ATC-3') que contenían sitios de restricción adecuados BglIII y XhoI (subrayados). Se amplificó el módulo promotor CmR/PorA a partir del plásmido pUC D15/Omp85 descrito anteriormente utilizando los cebadores **BAD20** (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') y **CM-PORA-3** (5'-CCG CTC GAG ATA AAA ACC TAA AAA CAT CGG GCA AAC ACC C-3') que contenían sitios de restricción adecuados BglIII y XhoI (subrayados). Se clonó este fragmento PCR en el plásmido de PCR circular obtenido con los cebadores CIRC1-PQ-Bgl y CIRC1-PQ-Xho. Este plásmido puede utilizarse para transformar cepas (cps-) y (cps-, porA-) del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. La integración por doble cruzamiento en la región cadena arriba de pilQ dirigirá la inserción del promotor porA directamente cadena arriba del ATG de pilQ.

Se amplificó otro módulo a partir del DNA genómico de (cps-, porA-, D15/Omp85+) del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* recombinante que sobreexpresa D15/Omp85 por reemplazamiento de promotor. Este módulo contiene el gen cmR, el promotor porA y 400 pb correspondientes a la secuencia adyacente 5' del gen D15/Omp85. Esta secuencia se ha probado que es eficaz para sobrerregular la expresión de D15/Omp85 en *Neisseria* y se ensayará para la sobrerregulación de la expresión de otros antígenos *Neisseria*. Los cebadores utilizados para la

amplificación fueron **BAD20** y **CM-PORA-D153** (5'-CGG CTC GAG TGT CAG TTC CTT GTG GTG C-3'), que contenían sitios de restricción XhoI (subrayado). Se clonó este fragmento PCR en el plásmido PCR circular obtenido con los cebadores CIRC-PQ-Bgl y CIRC2-PQ-X.

5 Este plásmido puede utilizarse para transformar las cepas [cps-] y [cps-, porA-] del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. La integración por doble cruzamiento en la región cadena arriba de pilQ dirigirá la inserción del promotor porA 400 pb cadena arriba del ATG de pilQ.

10

Ejemplo 17 Construcción de un módulo kanR/sacB para introducir mutaciones "limpias" sin marcar en el cromosoma de *N meningitidis*

El objetivo del experimento es construir un módulo de DNA

15 versátil que contenga un marcador selectivo para el rastreo positivo de la recombinación en el cromosoma de *Neisseria meningitidis* (es decir el gen kanR) y un marcador antiselectivo para suprimir el módulo del cromosoma después de la recombinación (es decir el gen sacB). Mediante este

20 procedimiento cualquier DNA heterólogo introducido durante la recombinación heteróloga será eliminado del cromosoma de *Neisseria*.

Se obtuvo un fragmento de DNA que contenía el gen neoR y el gen sacB expresados bajo el control de su propio promotor por

25 restricción del plásmido pIB 279 (Blomfield, I C, Vaughn, V, Rest R F, Eisenstein, B I (1991), Mol Microbiol 5 1446-57) con enzima de restricción BamHI. El vector receptor derivaba del plásmido pCMK, anteriormente descrito. Se suprimió el gen kanR de pCMK por restricción con las enzimas NruI y EcoRV. Este

plasmido se llamo pCMKs Se insertó el módulo neoR/sacB en el pCMKs en un sitio de restriccion BglII compatible con los extremos BamHI

La *E coli* que alberga el plasmido es incapaz de crecer en presencia de sucrosa al 2% en el medio de cultivo, confirmando la funcionalidad del promotor sacB

Este plasmido contiene las secuencias recombinogénicas que permiten la insercion del módulo en el locus porA del cromosoma del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* Se obtuvo *Neisseria* recombinante sobre placas de agar GC que contenian 200 µg/ml de canamicina Desgraciadamente, el promotor sacB no era funcional en *Neisseria meningitidis* no se observaron diferencias de crecimiento en placas de agar GC que contenian sucrosa al 2%

Se construyó un nuevo módulo que contenía el gen sacB bajo el control del promotor kanR Se realizó una PCR circular, utilizando el plasmido pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech, EE UU) como molde, con los oligonucleótidos **CIRC-Kan-Nco** (5'-CAT GCC ATG GTT AGA AAA ACT CAT CGA GCA TC-3') y **CIRC-Kan-Xba** (5'-CTA GTC TAG ATC AGA ATT GGT TAA TTG GTT G-3'), que contienen sitios de restriccion NcoI y XbaI adecuados (subrayados) El fragmento PCR resultante se purifico por gel, se digirió con NcoI y se ligo al gen sacB generado por PCR del plasmido pIB279 con el oligonucleótido **SAC/NCO/NEWS** (5'-CAT GCC ATG GGA GGA TGA ACG ATG AAC ATC AAA AAG TTT GCA A-3') que contiene un sitio de restriccion NcoI (subrayado) y RBS (negrita) y un oligonucleotido **SAC/NCO/NEW3** (5'-GAT CCC ATG GTT ATT TGT TAA CTG TTA ATT GTC-3') que contiene un sitio de restriccion (subrayado) Se ensayó en los clones de *E coli* recombinantes su sensibilidad en placas de agar que contenian sucrosa al 2% El

nuveo modulo kanR/sacB puede subclonarse en pCMKs y utilizarse para transformar una cepa cps- del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. La sensibilidad a la sucrosa adquirida estará confirmada en *Neisseria*. El plasmido pCMKs se utilizará para transformar la *Neisseria* kanR/SacB recombinante para suprimir el módulo entero insertado en el cromosoma en el locus porA. Se obtendrán *Neisseria* recombinantes limpias en placas de agar GC que contengan sucrosa al 2%.

Ejemplo 18 Uso de secuencias recombinogenicas pequeñas (43 pb) para permitir la recombinación homologa en el cromosoma de *Neisseria meningitidis*

El objetivo del experimento es utilizar pequeñas secuencias recombinogenicas (43 pb) para dirigir inserciones, modificaciones o supresiones en el cromosoma de *Neisseria*. El éxito de este experimento facilitará en gran medida el trabajo futuro, en terminos de evitar etapas de subclonación de las secuencias homologas en *E. coli* (las secuencias recombinogenicas de 43 pb pueden añadirse fácilmente al cebador de amplificación de PCR). Se amplificó por PCR el gen kanR a partir del plásmido pUC4K con los oligonucleótidos **Kan-PorA-5** (5'-GCC GTC TGA ACC CGT CAT TCC CGC GCA GGC GGG AAT CCA GTC CGT TCA GTT TCG GGA AAG CCA CGT TGT GTC-3') que contiene 43 pb homólogas a la secuencia adyacente 5' del gen Nmb porA (negrita) y una secuencia de incorporacion (subrayado) y **Kan-PorA-3** (5'-TTC AGA CGG CGC AGC AGG AAT TTA TCG GAA ATA ACT GAA ACC GAA CAG ACT AGG CTG AGG TCT GCC TCG-3') que contenia 43 pb homologas a las secuencia adyacente 3' del gen NmB PorA (negrita) y una secuencia de incorporación (subrayado). El fragmento de DNA de 1300 pb

obtenido se clono en un vector pGemT (Promega, EE UU) Este plasmido puede utilizarse para tranformar una cepa cps- del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* Se obtendra *Neisseria* recombinante sobre placas GC que contengan 200 µg/ml de canamicina Las integraciones resultantes de un doble cruzamiento en el locus porA se rastrearán por PCR con los cebadores PPA1 y PPA2 como se describio anteriormente

Ejemplo 19 Protección activa de ratones inmunizados con WT y ampollas de *Neisseria meningitidis* recombinante

Se inmunizaron los animales tres veces (via intraperitoneal) con 5 µg de diferentes VME adsorbidas sobre Al(OH)₃ los dias 0, 14 y 28 Se realizaron las tomas de sangre los dias 28 (dia 14 post II) y 35 (dia 7 post III) y se ensayaron el día 35 (via intraperitoneal) La dosis de ensayo fue de 20 x LD50 (alrededor de 10⁷ CFU/ratón) La tasa de mortalidad se controló durante 7 dias después del ensayo

Las VME inyectadas fueron

- Grupo 1 Ampollas Cps-, PorA+
- Grupo 2 Ampollas Cps-, PorA-
- Grupo 3 Ampollas Cps-, PorA-, NspA+
- Grupo 4 Ampollas Cps-, PorA-, Omp85+
- Grupo 5 Ampollas Cps-, PorA-, Hsf+

La Figura 15 iustra el patron de estas VME por analisis PAGE-SDS (tinción de Coomassie)

24 horas después del ensayo hubo un 100% de mortalidad en el grupo de control (inmunizado solo son Al(OH)₃), mientras que los ratones inmunizados con las 5 preparaciones diferentes de

VME estaban todavia vivos (sobrevivieron de 7 a 8/8 ratones) Se controló la enfermedad durante los 7 dias y los ratones inmunizados con ampollas con NSPA sobreexpresada parecieron estar menos enfermos que los demás grupos La PorA presente en las ampollas PorA+ es probable que confiera una proteccion extensiva frente a la infeccion por la cepa homologa Sin embargo, la protección inducida por ampollas sobrerreguladas con PorA- es probable que sea debida, al menos en alguna extension, a la presencia de una cantidad aumentada de NspA, Omp85 o Hsf

10

Ejemplo 20 Inmunogenicidad de las ampollas recombinantes medida por procedimientos de ELISA especifica y de celulas enteras

Para medir la capacidad de los anticuerpos de reconocer los antigenos presentes en la superficie celular de MenB, se ensayaron los sueros de raton agrupados (del Ejemplo 19) por ELISA de células enteras (utilizando células inactivadas con tetraciclina) y se expresaron las valoraciones como valoraciones de punto medio Todos los tipos de anticuerpos de ampolla inducen una alta valoracion Ab de celulas enteras, mientras que el grupo de control negativo fue claramente negativo

Ampollas	WCE (H44/76)	
	valoracion de punto medio	
	14P2	14P3
CPS (-) PorA (+)	23849	65539
CPS (-) PorA (-)	20130	40150
CPS (-) PorA (-) NSPA (+)	8435	23846
CPS (-) PorA (-) PME85 (+)	4747	16116
CPS (-) PorA (-) HSF (+)	6964	22504
(-)	51	82

Se llevo a cabo la respuesta especifica Ab a la proteina HSF recombinante Se recubrieron las microplacas con 1 µg/ml de
 5 molecula HSF de longitud completa

Los resultados ilustrados en la Figura 16 muestran que hubo una buena respuesta especifica de HSF cuando se utilizaron VME sobreexpresadas para inmunizar los ratones (utilizando HSF recombinante purificada en las placas) Las ampollas de HSF

sobreexpresada inducen un buen nivel de anticuerpos
especificos

SEC N° ID 1

Secuencia de nucleotidos del vector pCMK(+)

TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTGCTGCGCTCGGTCTGCTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAATCGAGCTCAAGTCAGAGG
TGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAAGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCCT
GCCGCTTACCGGATACCTGTCGCGCTTTCCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCA
GTTCCGTGTAGGTGCTGCTCCAGCTGGGCTGTGTGCAAGAACCCCTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGT
AACTATGCTCTGAGTCCAACCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC
GAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACCAACCGCTGGTAGCGGT
GGTTTTTTTGTTTGCAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC
TGACGCTCAGTGAAGCAAACTCAGCTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTT
TAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT
GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCTGACTCCCGTGGTGTAGATAACTACGATACG
GGAGGCTTACCTATCTGGCCCGATGCTGCAATGATACCGGAGACCCAGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA
ACCGAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATGTTGCGCG
GAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCGCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTGTCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTC
GTGTTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTGTGCAAAAAAG
CGGTAGCTCCTTCGCTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTG
CATATTTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTACTGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGATA
GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTTCGCGCGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGC
TCATCATTTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCACT
CGTGCAACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAGGGAAATAGGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGG
GTTATTTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTTATTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGA
AAGTGCACCTTGACGTCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACTATAAAAAAGGGGTATCAGGAGGCCCTTTGCG
TCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCACTCCCGGAGCGGTACAGCTTGTCTGTAAAGCGG
ATGCCGGAGCAGACAAAGCCGTCAGGGCGGCTCAGCGGTTTGGCGGGTTCGGGGCTGGCTTAACATGCGGCATCA
GAGCAGATTGTACTGAGAGTGCAACATAAAATGTAAAGTTAATATTGTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAT
CAGCTCATTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAAATAGCCCGAGATAGGGTTGAATG
TTGTTCCAGTTTGAACCAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGAATCCAAAGTCAAAAGGCCGAAAAACCGTCTATCAGGGC
GATGCCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTFTTGGGTGAGGTGCGGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTA
AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGGCAAAAGGAGCGG
GCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCAACACACCCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGC
GCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATGCGGTGTGAATACCGCACAGATCGGTAAAGGAGAAATACCGCATCAGGCGCCAT
TCGCCATTCAAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGCCCTCTTGGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGG
ATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACCCAGGGTTTCCAGTCACGAGTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGC
TTGCGGTCTGAATACATCCCGTCATTCTCTCAAAAACAGAAAAACCAAAATCAGAAACCTAAATCCCGTCATTCCCGCGCA
GGCGGAATCCAGTCCGTTCAAGTTTGGTCAATTTCCGATAAAATCTGCTGCTTTTCATTCTAGATTCCCACTTTCTGTG
GGAATGACGGCGGAAGGGTTTGGTTTTCGATAAATTTGAGGCATTGAATTTCTAGATTCCCGCTGCGCGGAA
TGACGGCTGTAGATGCCCGATGCTCTTATAGCGGATTAAACAAATCAGGACAAAGCGAGGCCGACAGACAGTACAG
ATAGTACGGAACCGATTCACTTGGTCTTCAGCACCTTAGAGAACTGTTCTCTTTGAGCTAAGGCGAGGCAACGCCGTAC
TTGTTTTTGTAAATCCACTATAAAGTCCGCGTGTGTTTTTATGGCGTTTAAAAAGCCGAGACTGCATCCGGGCGAC
AGCGCATCGGCCCGCAGGAGTCTTGGAGTCGGAGCATCAAGGGCGAATTCGCAAGGGGGGGGGGGAAGCCAGCTT
GTGCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCAAGATAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAA
CAGTAATAAAGGGGTGTTATGAGCAATATTCAACGGGAACGTTGCTCGAGGCCGCGATTAAATCCAACATGGATG

b

[illegible]

5

10

15

Secuencia de nucleótidos de la región de DNA (997 pb) cadena
arriba del gen NspA en la cepa Z2491 del serogrupo A de
Neisseria meningitidis

[illegible]

126

SEC N° ID 5

10

15

SEC N° ID 6

20

25

[illegible]

5

NCCCTCTTAT TT*ACCATAGACAGCTATTGATTTCATATTAT*TGATGCTGTA*TAATTT TTCTTAATTTAATTC
 CTCACGTTATTCTTCTTAATTACTTGAAGAAAGGCACAT

SEC N° ID 10

**Secuencia de nucleótidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen FrpC de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)**

[illegible]

15

SEC N° ID 11

**Secuencia de nucleotidos de la región de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen Omp85 de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)**

[illegible]

25

TATGAGTGGAASTCTGCTCTTCACCTTCAATYATCTGAAATACGGAAATGTTGACCCG
AAACACGCAAGTCCGCBATGACGCGAGGAGAAACAGTACGCTGATGCTAAACG
GAACAGTTCGACAAAGTATGTTCTCCAGGCGAGGCGACCGATGAAAGAGATTCGA
AACGACCAAAAAGTCTGTTATCGGGGGTCTTGGTACGGGCATATGCGAACGGCAGAC
TGGAGCGGCAAAAGCTTCCGATTAAGAGGGCGGCGACAGGGCGGACTTTACTGTGAATTC
GCTACGAAAGAAATTAACGGGAGCTTAACGGCTGACACAGAGGAGCGGCAACCTTTACC
ATTGTTGCGCAATTGAGGGCGAACGGTTTTTCGGTACGG GAAGACTGCTGACTCAGGT
TTTGATCTCGATCAAGCAATTAACACCGCGACGCTAAGGCAATATACCAAGCGCAAG
GTGAGGGCGGTTTTTA GAGCGCAAAJCGGAGAGTTGGGCGCATGGTTTGCTATTCC
GACGATTAACAAACGAAAGTGCACALATGCAATCGGCAATGGAAATTCAGCAAGCACT
GCAACTCTGCTATTCTGGTGGGAAAGGCGAAAGGCTGTGCAATAGCACGTTGCGGAGC
AATCAAGCAATAAGGCTCAGAGGGCAGCGCTCTTCCGATACCGTCTGAAGCGAAGACT
AGGGAACAC"

5

10

SEC N° ID 18

15 Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (373 pb) cadena
arriba del gen *OmplA* de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)
(ATCC13090)

GTGAGTGTGCTCTGCTCTTCACCTTCAATYATCTGAAATACGGAAATGTTGACCCG
AAACACGCAAGTCCGCBATGACGCGAGGAGAAACAGTACGCTGATGCTAAACG
GAACAGTTCGACAAAGTATGTTCTCCAGGCGAGGCGACCGATGAAAGAGATTCGA
AACGACCAAAAAGTCTGTTATCGGGGGTCTTGGTACGGGCATATGCGAACGGCAGAC
TGGAGCGGCAAAAGCTTCCGATTAAGAGGGCGGCGACAGGGCGGACTTTACTGTGAATTC
GCTACGAAAGAAATTAACGGGAGCTTAACGGCTGACACAGAGGAGCGGCAACCTTTACC
ATTGTTGCGCAATTGAGGGCGAACGGTTTTTCGGTACGG GAAGACTGCTGACTCAGGT
TTTGATCTCGATCAAGCAATTAACACCGCGACGCTAAGGCAATATACCAAGCGCAAG
GTGAGGGCGGTTTTTA GAGCGCAAAJCGGAGAGTTGGGCGCATGGTTTGCTATTCC
GACGATTAACAAACGAAAGTGCACALATGCAATCGGCAATGGAAATTCAGCAAGCACT
GCAACTCTGCTATTCTGGTGGGAAAGGCGAAAGGCTGTGCAATAGCACGTTGCGGAGC
AATCAAGCAATAAGGCTCAGAGGGCAGCGCTCTTCCGATACCGTCTGAAGCGAAGACT
AGGGAACAC"

20 SEC N° ID 19

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen *Plal* de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)

16

5

15

20

[illegible]

25

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena

arriba del gen Lipo02 de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)

[illegible]

5

10

SEC N° ID 22

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen Tbp2 de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)

[illegible]

15

GCTGGCGGGTCGAGACCTTTGCAATAACATAGGTTACTAA

SEC N° ID 23

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen PorA de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)

[illegible]

25

136

SEC N° ID 31

[illegible]

10

15

20 SEC N° ID 32

1 MCGTACCTGCTGCTGCTCAATTCAGCATTTTCATATAGCTTAAATATATTCATATCTAAATCGAAAGCAAA

[illegible]

25

[illegible]

SEC N° ID 36

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen msbB de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)

[illegible]

10

~~ALL INFORMATION CONTAINED HEREIN IS UNCLASSIFIED EXCEPT WHERE SHOWN OTHERWISE~~

SEC N° ID 37

15 Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen htrB de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)

[illegible]

20

SEC N° ID 38

25 Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen MltA de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B)

CACAAAACCAAGTTATGACGGGAATAGGTACAGCAGCCAAACCAAGGCTCGGCCCTG
GTCCGATGCTCGGTATAGCCGAAATAATCCGCGAGCGACAGCCCAACGGGCTGTCTTCG
TGCATAATATTTGATGAGTGGAAACACATGTCTTGAGCGCGTTCCAAATGCTGCTTCG
TGCAGCGCACGCGACGAAACCGGCAACGAGACCAAGCGGCAAGATATCAAAAACGGGCT
GTCCAAACGAAAACTTCGCGAATTCAGCGCCATCCACGCTGTATAAATCAACGGGCA
ATCACGGGCGGCGACCAAAAGCCGCTACCGCAACGGCGGCAATCTGCCACGTGCGGCTC
TGTTTGAATACGCGAAGCAGGAAAAAACGCTCTCCAAACCTTCGCGCGCCACGGCAAGA
AACGCCATACCGACCAAGGCCATGCTTGACCGCTGCCACGTTCAAAAGCGGCTGCACA
GAATCTGAAGCTGCCGCTTCATCGAACGGCGGCTTTTTTCATCCATAAAATCATATAA
GTCCGATCGCGACAGCAACCAACCGATAATGCCGACGAGAACTCTCTGCTGCTTC198
GGAATCTGCGCGGTTGCGAATGGAATCCGTAACCGCGCCCAACACATCAAGAGCA
AGAACAAACCGCAACGAGGCTTAGGCAATCAGTTTGGAAATGTCCGAGCTTTTCAGAAAA
CGCGCAAGATGCGGACGATGAGCGCGGCTTCGATACGCTCGCGCAACATTAATAAAAA
CGACCGACATAAACCGAACGAAACAGGATGATGAATATATATATCGGAATATTTTC
ATTGCTTGTAATACAAATGCAAGTTATTTTTATCTGCGTACGCGCGCGGGAAGTTTC
CGCAGCTGCAGCTGCGCGCTGTGTATAAATCCGCTCTCCACGGCTGCGCGCAACGCGCGC
GAACCAATCTTTCTTATTACTGCGCGCAACATTTGTCAAT

5

10

SEC N° ID 39

Secuencia de nucleótidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen ompCD de *Moraxella catarrhalis*

GCTGATTTGTGAGCAGCGGGCGCATCGGGATTACCTTGCAATTTGGAGAGATCGTGS
ACATATTCAGATGAGATGTTTATGAAATGATTGGGCAATTGACACACGATGAACT
TGAGATGGCAGTCACTGATGAGATGCTAAATATTGCCATAAA.XTACGACGAGCATGGGT
GTGTTTATGTAACGAAAAACGCCAAGAGCTGACTACAGAGGTGGGCTTGATATGCGCA
TTTATCAAAATATTCAGCAATTTATACACAGTCTTCAGCAGGCGGATATTAAGCTTTC177
ATTCAATCGATCCAGATCCGCAATCAAAATGATGCTGCAATTCCTTTGGGTGCTGATGCGAT
TGACCTGCATACGGGAGCTTATGCTCAAGCGACTTTACAAATAATCAAAAGCTTGTGCA
TAAGAGCTTGACCGTATTCAAAAAGCCGTTGCAATGGCACAAAAAATCATCAATATT
GATTAATJCAAGCTCATGCTTGACGCTGATAAATGTTCCAGLCAATGCCCAAAATGATGG
TATTCATGAGCTGAATATCGGCGATGCAATGATTCAGATGCGGATATTTATGGGGCTTGA
TAATGCAATCAAGGCAATGAAATGGCTTTTATCAAGATAAAACGACCAATCATTCATG
CGTTAGAAAGAAATCGTAAATATGATGACTATTGTGTAATATTAATGATTTTGTTC
AAAAAGGTTGTAAAAAATTCATTTACATTAAGCTAAGCCACAGGCGACAAATGAATA
CCTATGCTTTGACTCATTTGTCACCTAAGAATCGCAAAATTTGTAAACAGATTTATGGC
AGTCTTGGATCGCTATGCTAAATAGGTGCGGTAACTTGAAAAACCAACCATTCCTTG
GAGGAATTTATGAANAAGGATATAAACGCTCTTGCGGTATCGCAGCGCTGCGAGCTCC
AGTTGCAGCTCGAGTTGCTGCTCAAGCTGCTGTGACACTC

15

20

SEC N° ID 40

25 Secuencia de nucleotidos de la región de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen copB de *Moraxella catarrhalis*

GATGCTGTTAAAGTGGGTATTGGTCTGGTTCTATTTGTACAAACCGTATTGTTGCAGGC
ATTGGCGTCCCGCAGATAAGTGCCATTGATAGTGTGGCAAGTGCCTTAAAGATGCGATT

CCTTTGATTGCCGATGGGGTATTGGTTTTCGGGTGATATGCCAAAGCATTGCGAGCA
 GGGCGTCATGATTATGCTGGGGTAGCTTGGTGGCAGTACCGAAGAACACCTGGTGAG
 GTGGATATTTTCCAAGGTCTGTGTTATAAGGCTTATCTGGTG AGTGGCAGCTTGGGAGCA
 ATGCTGTGTCAGAAATGGCTCATCGATCGTTATTCTTCAAGT CAAGAATGGTGTGAA
 AAACTGCTTCCAGAGGGTATCGAAGAGGGGTGTTCTTTATAAGGCGCTGGCGAGGCTC
 ATCGTCTCAATTGCGAGTGGTCTATGATCATCATGGTCTATACAGTGTGGCAGCAATC
 GAAACGATGGTGAAGATACCGAGCTTTGTCAAATGACTTCGGAGGCGATGAACGAATCG
 CATGTTACAGATGTCACAGATTACCAAGAAGACGCCATATATGCCGAAAATTAACATCTA7
 TAATAGGCTATCAACAGCACTCTATTAGATAGGCTGGCTGTTTTAGAGCATAAAAAATC
 ACTGACACATGACATTATGTCATATTTTAAAA CCTTTTATTATGATTATTTAA7T5AG
 ATATATGGCTAAAGAAATACAGGATATTTAAATTAAGGTTTCAAAATCAAGCGATTAGTGA
 AATATATGAATAAATAACAAATATCTGTAATTTTAAACAAATAATATCAATATCAT
 TTCAAGAAAAAATTTTATTGATAAAACTTACTTCTACCTTGCTATTTCTCTATT
 ATCATTTTGGCGGCTTTCTGTTGATTTGATAGTAGTACGAGCAAGGGATAATTTGAC
 AAAAACAAATTTGATTTCAGCGCTCATATTCGAGGTATT

10 SEC N° ID 41

**Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen D15 de *Moraxella catarrhalis***

AANCTGGTGATGCTCTACCTGCTATTCAAGGTGACCAATCAATGATTGGCTAACTGCC
 ACCAAGATTATTCAGGCAAAACGCAAGAACATGCTGTGTATGTCAGCAATCGCTCAAGCT
 ACGCAAGCTTGATTAAAATTAATGGCCCGGTGTGTAAGACCAAAACCGGTGATCGGTC
 CAACCTGGGATATCGCCGCCAGATGTATATCGTACGCTCTCTGTAATAATTCGTGATZ
 ACGATTCAATATGATGTGTCGTGAAGCATTTACTCAAGCACTCCGCAACCTATTGATTTA
 TCAATAATAGCTCTTAGATGACCTGGGTAAAGTATCTACAGGAATCTTGGCATTAAGAAAT
 CTAATCAGTGCCCATGCCATTGCGGATGTTCTAAGACAGTTTGTAGTTGGGATTTCAA
 GAGTGTATTGCAAGCCGAATCATCATGTTTAAGCTTGGCAATCTGAATCTTTATCCAC
 ATTCAGTGTATGAGTGGCGGGCATTTGGTATTTATACTATTGAATGATATATGGCAAA
 TCTATTGAATGAAGCGGTGCGATGTCGACCAATTTAAAGCGGGTGCCTATTGCTTTTGTG
 TCTATGTTCTTGCAATCAGTAAAGCATATCATGCGCATTTTGGCTAAGTCTCGAATTATZ
 CGTACATTAACAAATAATTTTGGCTTTTAAAGCTGAATATCTGCGCAATTTTACTGTTT
 TGGCTATCCTTTACACATATAAATTTGGGTGTAGAAAATTTTGGATACATTTTATATACC
 TATTTTTGAAGAAATTTAAAATTAAGTTTGGATAGCATTTATGCTGAATTCATATTTAA
 ACGTTTTCAGGCTAGTGCATACCAATGCGCTGATCATGTTGTAATGTCAACTATGCACA
 AGCGGCGGCTATTTATGCGCAATGCACTTGGCCATCAGGAAGTACAGCGGATGNCATTTGA
 AAGCTTACAAAGCGTGTGCGGCTTTTCTTGGGTCAAGTG

15

20

SEC N° ID 42

**Secuencia de nucleótidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen ompA de *Moraxella catarrhalis***

25

141

ACTTGGCGAAAAATACCATTTATATCGATTGTGATGTTATACAGGCGATGCGCGTACACG
CACAGCCAGTATCAGTGGTCTGCGGTGGCACTTATGATGCTTTAGAACACTTGCAGCG
TGGTAAAAAGCTTACCCAGATCGGTTTTTGGGCTGGTGGCAGCGGTTTCTGTGGGTCT
TAATCAAGGCGGTGTATGTCTTGATTGGATTATGCTGAAGATTCACTTGTGATACCGA
TTTAAATGTGCTCATGACGAGGCGAGTGGGTTTATTGAGATTCAAGGCGACAGCACAAGA
AAAGDCATTTACTCTGCTGAGCTAATGGGATGCTTGAATTTGGCAGAGCTGGGAATTGG
GCAGATTATCGAAGCCCAAAAGCAAGTATTAGGCTGGTGATA"GGTAACTGTTGAAGATA
ATGGCGTGATCATCACATTAAATGGACAAGTAAAGAACCAATTATTTGGTGGTGGATGA
TATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTGGTGGCAATCATTGTTGATT"CCACCGCTTTTATG
CAATCGGTGGGTTCCCTTTATTTCCAGTGTGGTATTTGGTGT"AAATTCAGAGGCAAA
AAGCCAAACCTTGCATATGCTTTTCCAGAGTGGTGAAGATTACGTCCAAAGCGTTTC
AGATTCAACAACATCACTAACCTTATCAGCATCGGCAACAATATCTGTAAGATAACA
AAATGACAAATTC"TGATGGGGCATTTGAATATCATTTCACAGT"TTTGTGATGACCGGTG
AAATTAATATAGCCAAACAGGTACTTTTGGAAAGTCAATCAAAACCAATGCGGTGGCGG
TAACATTGGCTAAGTAGTTTGTGTGATACAGACAGGTGGATGGTCTTTAAGTCCACCCA
CCTAAGCTTTTCTTGTGTGGATTGAAGAGTATGTATGATGGCGAGGATTTATTTTAA
GTGATCATTTAATGCAATCAGTTGTCAGAGTAGCGGTC

5

10 SEC N° ID 43

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen hly3 de *Moraxella catarrhalis*

GTGATGGCAACACCCACCATTCAGGAGCAACCAAAATGGCCGTGCTTGCCTGTCTT
GGTGGTATCATTGGCAGGGCAATGTGGCTAAGTAGTGGTGGCCATCAGGTGGGTGGT
GGTGGTGTACGATTCGTTATTGTATATAAAATATCCCTTTGGGCTGGATGATCAATG
AAATACCCCTACGGTTGTATGGAAATTTATCCATTGTACCAAGGTATTGGTCTTTAAAT
TAACAAGCAGCTTCTAGCAAGTCAAAATTTTATGCCCTATTTTTCAGATTTAAGGTAC
AAATAAGCCCAATTTGTAATATATGGTATTGTATGATTTATGATGAATTGGGACCAAAA
TTTTGCAAAAATTTATCCCTTAGATGCGTTAACAGATGCTGAATGGGAAGCATTATGTGAC
GGATG"GCAGCGTGTGTGTGGTGAAATTTCTTGATGATGACAAATGTTAAATTGACCGAA
TATACCGATGTTGCCCTGCCAGCTATTGGATTTGCTCAACAGGATTTTCCAAUAATATGCC
AAGGCTCAAAAGGATTGTGCCAGATTGTATTGCTTAAACACCTGATATGCTGCTGATATG
CTGTGCTTGGCAGCCATTGTGCTTATAAGCGGTTGTATCTTGGGCAAAATCTGCCAGCA
TGGCAGAGGCTCATTAACATAGCCAAACCAATGGTCCAGGATTTGGCAAAATTTCAACT
GCTGGGCGATGTGTGATGAGCTTGGTATGAGTGATGAAGACATAGAAAAGCGAGTGGTG

15

AAATGGGTTAAACCTTGACATGATTGTTGACATGATTGACAGACATAAAAATTTGGCAA
TTTGATAAAAATGGTGTATGTGTGTGATTATCAAAAGCACTTGAATAAACCGAGTGA
TAGCGCTAAATTTGTAGCAACCAATCAATTCATCATAATTTAATGAACAGGATTAAT
TATACTGTCTATGCTGTGATGACAAATTCAGCACTTGGTCG

20

SEC N° ID 44

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen lbpA de *Moraxella catarrhalis*

25

TAACAAAGGCNACCCNACACGCGAGTTATTTGTGCAAGGCGGTCAAGCGGATGTCAGTAC
TCAGCTGCCCACTGCGAGGTAAATTCACCTATAATGGTCTTTGGGCAAGGCTAOCCTGACCCA
GAAAJAAGACAAAGGTTATAGCAAGATGAGGATACCATCAAGCAAAAGGCTCTAAAGA
TTATATATTGACCAAGACTTTATCCACAGATGACGATGACGATGACGATGACGATGACGATG
TTTGACCGCATCTGATGATTCACAAGATGATATACACATGGGATGATGATTTGATTC
ATCTGATGATTCACAAGATGATGACGACGATGGGATGACGATGACGATGATTTGGGTGA
TGGTGCAGATGATGACGCGGAGGCAAGGTGATATGACGATTAATATTGCCCCGAATT
TGAJAACAAATACTTTGCCAATTATGAGGCTACTCATGAAJAAGCTTTGCCCTAGATGG
TAAJAATAAGGCTAAGTTTGATGTAAACTTTGACACCAACAGGCTAATCTGTAATTAJA
CGATGAGAGAGGTGATATCTCTTTGATATCAAAATGGCAAAATTGATGGCACAGGATT
TACCGCCAAAGCGATGTGCCAAACTATCTGCAAGAGTGGGTAAACAACCAAGGTGGCGG
TTTCTTATACAACATCAAGATATTGA*GTTAAGGGCAATTTTGGCACAAATGGCGA
AGAGTTGGCAGGACGGTTACATCATGACAAAGGULLATGGCATCACGACACCGCGAANA
AGCAGGGGCTGTCTTTGGGGCTGTTAAAGATAAATAAAGCCGCCCTCATCATCTTTAGT
GCTTGGACCGACAGTTGATGACGCCCTTGGCAATCTTTAAACAGCACTTTGAJAAGT
GCTTGGGCGAATTCTTGCAATAATGCAACAGATTGGCTCGCGCTAATATCTTGATAAA
ACATCGCCATAAAATAGAAATAAAGTTTAGGATTTTTTT

5

10 SEC N° ID 45

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen lbpB de *Moraxella catarrhalis*

CAGCTTGACCAATTGGTGAATATATACCAATTTGGTGGTTTGTGGATATTTTACCAGGG
CTTGAGGGGTGTCCTAGCCTAAGCCGTGGCGATGATANGCAACCCGCCCTCAATTTGGG
GGCGGCTGGGGGATAGGATTTGGTGGCGCAATTTGTTATGAGGTGGCATATCTGAGACG
ACCGGTAAJAATGCACTTGGCAGTAATTTTATTTAACCGTCTCAJAAGATCTTGGTTT
GGTACACAGCAGGCTCTTTGACGCAATTTACAJAATGGTGCJAATGCGAGGCTTGGAGCG
GGCGATGGTTTGTGCTGCAACAAACACGGAGTGACTGCAATTAATTGACCATCAAGCA
GGGA*TTATCAAGCAGATACCGCAGTTTCAGC*AGATATTTTGGCAGGTGATGACCCAGT
TATGTTGGACACACGCCCTATATGGTTTGGG*GCATTATCCCATGTTGGGGTTTTCTTTG
GTGCTGATTTTCTTAGTATCATGGCAAGAJAATGAAJAATACCACGCCCAAGCAAGAA
AJAATTTTATACCGCTGATGGTGTGGTAGACCGCTGAATTTGCCACTTTGGGCTTAGAG
CATGAGCAAGATTAGGGGTTGGGTGAGCTTTGGTTGATTTACTATCAGCCTACCGGAAA
CCTGCCAAACATCAACGCCCAAAACCTAAACATACAATGGCTAAJAATATCAJAJAATA
CTTGCTGATTTGTAAATTTCTTATGTTATCATGTGATAATAATTAATTAATTAATTAAT
ATCCATTACTAAACTTCATCCCATCTTAACAGTTACCAAGCGGTGAGCGGATTAATCG
ATTGACAGCAAGCTTACATGATGGCATCGGCTGATTTGCTTTTGGCTTGTGTGTTGT
TGTGGGAGTTGATTTACTTACCTTAGTGGTGGATGCTTGGGCTGATTTAATTAJAATTG
ATCAAGCGGTCTTGACAACACACCAACAGGATATCAC

15

20

SEC N° ID 46

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen tbpB de *Moraxella catarrhalis*

AGTTTGGCCCTGATTTTGAGAGCCACTGCCATCATGAATTTGTTGGGGTAAACACCACTCG
TATCTCTTTCGGTTTCDDCTTTCATGCAAAACACAGGGATACCGCGGCCCATJGCA
DGGGCGGGGTGGCTTTGGGTGCTAAATAATTTGCAATGATGTCAGCGAATTTCTGCAACC
AAGGCAACCAAGTCTCAATCAGGACCGCTTTTGAATGGTCATGTGGATACAGGCTAGG
ATTTTAGCACCTTAAGTGGTTGCTGGCTTGGATAGGCTTTCTTAACCCCATCAGGGCT
GGCATCTCAGCTTCTGCAAGGCAATCTCAGCGGJ CATAATCGGCTAAACZATATCA
GGCACTTTATAATCGGTGAAGTTTGGGTGGTACTTGGATTGATTGAGGTAGGCATATCT
TTATCTTAAGCTATTTTAAAGTATTTTAAACAATATTTGATGAATTTGAGATAATTG
ATGCTAAAAGTTGAATGACCAAOATCGCTAACAAATCAAGAAAGACATTTTAAGCAT
AAAGCAAAATGTGCTTTGATGGCTTATTATAACGTTATAT .ATAAATTTGGGTAGAA
AGTTAAATGGATCGTTGGGTAAAGTTTGTGGCTATCTTAATTAATTATATTTTAAAT
AATGCTTTTACTTTATTTTAAAAATAGACTAAAAAATGGTGGCTTTGGGTTTTATCTC
ACTATGGTAGATAAAATTGATACAAAATGGTTTGTATTATCACTTGTATTGTATTATAA
TTTACTTATTTTACAAACTATACACTAAAAATCAAAAATTAATCACTTTGGTTGGGTGG
TTTTAGCANGCAATGGTTATTTGGTAAACAATTAAGTTCTTAAAAAGGATACACGGTC
ATAAACAGATGGTTTTTGGCATCTGCAATTTGATGCTGCTTGTGATTGGTTGGGTGT
ATCGGTGTATCAAAATGCAAAAGCCAACAGTTGGTCATTG

5

10

SEC N° ID 47

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen *tbpA* de *Moraxella catarrhalis*

TTGGGGGGGATAAAAAGTGGTCTTTGCCCAAGGGGCATATGTGGAGGCAACCCAA
ATCTATGGCAACATCATCAAAATCACAATAATACACGACCATTTGGGGCAGACTGGGG
GCAATTTTGGGCTTTGCTGATGCCAAGAACCTTAGCATTGAGACCTATGGTGAATAA
AGATTTTATGGGCATGAGCGTTATACCGACACCATGGCATAAGCATGTGGTTGATTAT
AGAATCAACCCAAAAATTTCAAGGCTTAAGCGCCATAGACATATCAGCGCTAAACCAACAT
CGGAAGCCAGGGGTGACAGTAATAACACTTTATACAGCACATCATTGATTTATACCCA
AATGCCACAGCTATTATCTTTTGGGGGCAGACTTTTATGATGAATAAGTGCCACAGAG
CCATCTGACAGCTATGAGCGTCTGGGCTATGCGACAGGGGGGCAAGNATGGCGGGT
GGTCTTTCAAGCCGTGCCCAATCAGCATCAACAAAGCCATTACCAAGGGGCAACCTA
ACCAATGGCGGACAAATTCGCCAATGATAAAGAGATGCAAGGCTTTATCGCTTTGGCAC
AGAGACATTCACAAATGGGGCATCAGCCACGGCTGAACATCAGTACAAACATCAATAAA
AGCAATGACATCAAGCAAAATATCACAAAAATCAAA~TTTGTGAGTTAGTGGCATT
TTTTGATGGGATAACACGCGCTACTTTGTTTT~TAAAAAATGTCCATCATAGACA
ATATCAAGAAAAATCAAGAAAAAAGATTACAAATTTAATGATAATTGTTATTGTTAT
GTATATTATTAATGATAAATTTGCGTATTTGTGCAATCACAAGGCATTTATCATCA
ATGCCAGACAAATACGCCAAATGCAATTGTCAACATGGCAAAATAGGCATTAAACAGAC
TTTTTTAGATAATACCATCAACCCATCAGAGGATATTTT

15

20

SEC N° ID 48

25 Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen *ompE* de *Moraxella catarrhalis*

144

AAAGACATTACACATCATCATTCAAACGGCCCAACCATGTACCTCTGCCCGGTGGTGGCAG
GCGAAGCGCTTTTGATGGGGTGGCTGGGTTCAGATGGCTTGTCAATCATTTGGTTTTAT
TAAATTCATACCTTTGGTAGTTGGCTTTACCTGATATG*CATTTGAT*ATCGAAGCAA
TAGCGAGTTGACCAACATCAATTTTAGGCAATTTGCCAAGCACTCAATATTACCGCTCA
TAGGACCATGCTTGGTATTAAATCATCACATAAAGATCTTTACATCCATTGAAATGAC
ATTACCCAAATACGGCCATGCCCTCAAATTATGATGATGAAATGGTCCAAACAAATCCATT
GGCTATTTTTCACTCAACTCTCTGGCTCTGCCGATATTTTATACCCAAACGCTTTCTAT
TGTGGGGGTGAAGCTCAGGGGAAACTACCTTGGTGC AAAA ACTTGC CAAT TATTATGG
TGCCAGL ATGCCACCTGAAATGGGTGATTATACACACACTCCCATCTGG GGTAACGA
ACTLJLCTTCAATACAGGCACTAGGCATCCATTGCCATCAATCAGCCAAJCTA*CGA
AAGCGCTCTACCACTGCCAGCTCTGCTTTACACTGATTGATACTGATTTTGGCAGAAC
GCAAGCATTTTGTGAATTTATGAAAGGGGAAACGCATCCGCTTCTGCCAGAAATTTGCTAA
ACAAATGCGATTGGATTTTACGATTTATTAGATTAATAATGTTGCTGGGTGGTGAATGG
CATGGCTAGGCTTGGTGATGATCATCAAGCAGTTTCTTCCCAATAAATTGCTTGAGAT
TTTGGCAGATATGATATTAGTTATCATATCATTAATGACACCGACTAOCACAAACGCTA
TCTACAGCATTAAGCTTGATAGCAA*CATATTTTAAATCATTTTACAAAAA*TCATGA
CAATTAATTAGGGAATACTGATGAAATTGATTTTITAG

5

10

SEC N° ID 49

Secuencia de nucleótidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen uspa1 de Moraxella catarrhalis

GGATGTGGCATATCTGCCCATCGACCCAAATACACATCGGTGAGGCTATCAAGATGTGGT
ACGAATTAAATAGCCAGTCAGGTAA*JCGGTGCTGGGTATATCTTGACAGGGCAITTTGG
TTTTAATTTACACGCTGGACACA*ATTGATTTTGGTGGTGTGATACAGGCTTATGCAGA
AAGTATGGCGGTGAACTAAAACTGATGAGCTGCTTGAAATTTTACCCAAAGGCTATCT
TAAGCAAGATAAAATTCGGCTAAGTGACTATACCATCAGCAATAAAGGCCGATGCTGTCAG
CTTCCAAGGCCAAGTAGCGACACCCAAAGCGGTGTTTGAGGTGATTGGTCAAGGCCAATGG
TGGCTTATCTGGCTTCAATGATGGCTTGGTGAATCCACAGGCAGACGATTTATGTCAC
CAATTACGCCGAACACGCCATCGATAACAAAACCCATCAAAAACCGATACGGATAAACA
AACCGATGCCGCCGTGGCGCTTATATCCAGCTGTGCGTAGAGGGGCAGATTTATTGAGGC
ATCGCCACTTGCCATAGCACCGTATCCGCCATGCTAAJAG*TCATTATCCGCTTTGCA
CMGCGTGGTAACTGACCCAAATCAAAATCTGCTGATGATGCCAGGATTTATTATTAGT
GGCTGGCCCAACAATGATGATCATCAGCATGTGAGCAAAATGACTGG*GTAATGACTGAT
GAGTGTCTATTTAATGAAGATATCAATATATAAAGTTGACTA*AGCGATGCAATACAG
TAAATTTGTTACGGCTAAACATAACGACGGTCCAAAGATGGGGATATCGCCATTTAGCA
ACCTGATATCAGTTTGATAGCCATTAGCGATGCCATCAAGTTGTGTTGTTGTAATGCA
TATAAACGGTAAATTTGGTTTGGTGGATGCCCATCTGATTTACCGTCCCTCAATAAGT
GAGGGGGGGGAGACCCAGTCAITTTATTAGGAGACTAAG

15

20

SEC N° ID 50

25 Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen uspa2 de Moraxella catarrhalis

CCCAAGCTTTCCGTTTGTGTGCTGCTGG*G*CGGGCGGTATACCATGCTGGTGGTG
CCGATGGTGTGGGCGTGTATCAGATATTGGGCGAGTCTATLGAATGCGGTGGGTGAAT
GCTTTGATAAAACGGCAAAATGCTCAACTGCCCTATCTGGTGGCCAAATATCGAA
AATTAGCCAAAAACGGCAACCCACAGCCTATGAGCTGCCAAGACCATGCAAGATAAAG
GGCTGGATTTTCTTTCACTGGCATGAAACCGCCATTCAATATCTCATCAAGACACAC
CAAAACGCCAAAGCGACCCGCCACAGGACAGACATCGCCGCAAGCTTTGAGTATGGGG
TGGTGGTACTTTGGTCAAAAAA*GCACCAAGCACTACAGATGACAGGCAATCGCCAGC

[illegible]

5

10

SEC N° ID 51

**Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen omp21 de *Moraxella catarrhalis***

GAGTGAACCTTTATGTGAAAAATGATTCATTAAAGTATCAAAATCATCAAAACGAGCATC
AGGGTTTGCTAAATCAATTTTTCACCAATAATTAGCCATAGCAACGACCAAGGTAGT
TATGCGACGACGGTTCGCCGTGATAAAATATCAATTTGGAAACCAACACATATACCGATC
AGTCCGATGAGCATGCCGACGATATGACACGGTATATAAAAGCGCTGGGTGGCGGCTTT
CAGCGTGACGGTATACCGCCGAATCACTTGGTCAAAACAGTGTCAAGCATCAAAATGTGA
TAAATTTTAGGAAAGAAACCGCTGAGGCTTATTTGGTCAAAATGGCAATAAAAACCGCG
TGCTTTAATCGTTTCAAGCGCTTATGATTAACCGCGCATAGCTTTTGCATCAATTTG
TTTAGGGGATATCTTGGCAAAAAATATCGTGGCGGATCGTGAAATCATGCTGATCATGA
CATATGATGTGCTTGCCATGCTCGCTCAACCAATTTAGGCAACATATGCCGACCGAGCT
TTTGATGATATCAATTTGGCATAGGCGGTAAGCTTACGCTTGGCATACATGCCATCAAGCGC
CGCCGCGAAATACGAGGGCCATGTCGATAGCGGTACCGTCAAAATGCAATATAATTCAGTT
TTTGCAGTATTGAAGTGTATGCTTTTCTATTTCTTTTCTTTTAAATTTGGCGGCTTT
TGGTATTTTAAATGCGCAATTTACCAATTTGTCAATATGAAAGCAAAATGACAAATTT
AGCAATTTTATGTGCTATTTTGGCAGGTTTATGAAAGCTGTGCATTTGGTGTGCAAA
CTTTACACATGTAGCTATAAAACCTGCGACAGTTATAAGAAATTTTGTGTACTATAGGG
GCTCATTTGGACACAGACAGTTATTTGTAATAAGTATTTGCAAAAGCGGCTAAAAGAC
BAGATTTGGTCTTCTAGTATTTAAGTATGAGTAAAGCAAAAC

15

20

SEC N° ID 52

**Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen omp106 de *Moraxella catarrhalis***

25

TTGATCGGTTTTGCCCACTGTTTCATGATTACTCAAAACAGCGGCTTGATGCTGCTG
GCAGGTCTGACCCAAACCAACCAACCGGTGATCGATGCTTACTGCTTATGTTACG
CTTGATAGGOCATTTTGTATGAGATTTTCCAAGACTGCTTGGCAACGCTTAAAGCGG
ATCAAACTACCAACCATATAAGCGATATGCCATGAGCCACAACCTAAGCCAAACCGCT
ATATCAACAAGTTGAGCAGACCGGCAAGCGTTATTTGAGACATTGGGCGATGCTCATAC
TCATGATGCTATGCCACTTTTGGCGGAAATTTGAAAACCGCTGCTCATCGCGGCACT
CAATCACACCGCAGGCAATCAGTCAAAAACCGGCAAAATCTTGGTATCAATCGTGGCAC
ATTAAGCAGCAAAATGAAAACCATCACTTACTTTAGACCGGCGATTATCGCATGGATA
TGGGCAAGGTGCTCGCGCTGCGTATGATGGCGATGACACCGCATTTGCGCCATATCGG
AOGATTTGACATGATTTAACATGATGATGATTTAACATGATGATGATTTAACATTTGTT
TAATACGTTGGCATCATTAACATAATTTAGTAACGCAATTTGTAATAATCATTTGCGCGCT
TTTTTATGATGATCATATGAATAGAATATTATGATTGATGATGATTTGATGATGATGAT
GGTATGCTTACGAGTTGATTTGGGTTAATCACTCTATTATTGATATGTTTGAACATA
ATCTATTGACTTAAATCACCATAAGCTTATAATTTAGCATAATGGTAGGCTTTTGTAAA
AATCACATCGCAATATTGTTCTACTGTTACCACTATGCTTGAATGAGGATCCAAATCACC
AGATTCACTCACTGATCTGTTTGTATACGCAACCATTTAOCCTAATTTATTCAATCAAT
GCTATGTCAGCATGATCATTTTTTTAAGGTAAACACC

5

10 SEC N° ID 53

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen HtrB de *Moraxella catarrhalis*

A TATCTGCTTTTGTTTTCAAGATGCGAATGCCAAGTCAAGCACTGGCGATTAT
CAACTTCAGCAGGTGCTTCGGTCAATGGGCAATCTGCGCTCTGGTTTTTGGGAAGCGGA
TCACATCAGCGGATTGAGCTGCAACCAACCATCAGCATTAATCAGGCGATCTAGACCAATG
CCAAACCCCGTGGCGGCTGCAACCAACCGCAATGCAATCCATCAAAAATTAATCTTAA
GCTCTGCTCTCTTTAGAAATACCAAGGCAATCAATACCGGCTCTTGCAATGTCACCG
TATTAATAGCGAGGAAACCGCAACCAATTTCTGTGCAATTTAGTACCATGTCATAGGCA
TGGATAGGCGGTTTGGGACTTTGTTTGAATCTCTCAACCGAGGCTTTGGCGGCTTAA
AAGGATCTCAACTGATTTCCACTTACCATCATCAGTTTCTCAAAATTTGAAATCAA
CGACCCAAAGCGGTGCCATTACAGGTAAATAAATTAATCAGTACCGATTTTAATC
GCAATGCAACCATAGCATATTGACGATTTTGGCTTTATCGGCAACCAAGAAATGATAT
GGGCACTTTGGCATCGGTACGCTCAATCAGCTCAATCAAAACCTCATCGGTCATATTTT
TAATGATGGGTGATTTGATCTGATTTCTTTCAAGGCAATTTGATATTGCTTGGCT
CATTGACCTTAATATATGCAATCCAGGAGGCGCATTAATACCAAAATTTGGTGTACT
CATCATCTGCTTGGCACTCATGTTACCGGCAATTTGGAAATGGTANGGCAACAAACGGG
CTTTAGGATCTTGGCGGCGGCTGAAATACCTTTAAATTTCAACATGTTGCATGATGTCAG
CAACATCAATAAGTTTTAAGGAATGCGTAATCAGGCTTATCTGAGGCATATCAGCA

15

20

TGGCATCTGCGTAAGTCATGCGGGGGAAGGTATCAAACCTCA

25 SEC N° ID 54

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen MsbB de *Moraxella catarrhalis*

63/

TGGATCATATTCCTTTATTAATGGTACTGTTTAAACCTGTATTTAAAGTTTATTGGGTCA
 TATTTTCAAGGTCATGCCATCGCTCAAGGCTCATCATCAAAAGCTCATCAATCTCTACCA
 ATGGCTCAGCAGCTTCCTTCTGCGCCCAATTCGCTATTTAAACATGAGCCATCTTCAA
 TCTTTTGGCAGCTGTGGCTGCTCTTGTCTCAAGTGCAGCAATTTCAATAGGCAATCTT
 CAAGTTCACGCTGCTCTTTATAGCTGAGTTTGGCTTTTGGGCAAGCCCTGATTCAGGTG
 GTTGATTTGGATGGGTTCAAGCGGTTTGTG. G. CTTAGGTTTATTGTCTGTGGCGTAT
 GAGCAAGCCATCTTTCATGCTGTGTACATA. TCTTCATAGC&CCAAACATATCCAAAA
 CGATACCGTGGCGTACTTATCAGTATCAAAATACCCAGTTT>AAACACATTAACCA
 TAAAGCAGCGTCAAGCTGATGAGTAAATACCGT. CTTTAAATTTGAGCCAAATAAAT
 CTAAAGCTCAAGTGTGCCATATCCAAATCAT. GGTAGGCTCATCAAGCAACAAACAT
 TGGCAGCTTTAGCAATAATTTGGCCAAATAAAGCGCTGCTTTTCACCGGCTGATAGTG
 CTTTAAAGGTTGGCAGCAAGCTTTGGCGTAATAAAATCTTGCATATAGCTTAAAT
 TGTGGC. AGTTTTCACCAACATGACATGCTCAGACCTTT. GAAACA. TA. CTGGGA
 TAGATTTTCAGGCTTAGGCTGCTCTTTCAGTGGTCAAAAGCAATATTTAGATTGG
 TGGCAAGCTTAAGTGAAGCTGACTGAATCGCTGAATCATCCAAAGCCAAATGCTTTTAA
 TTAAGGTTGTTT. ACCAAGGCAATTTTGGCAATGATACCAACTTTATCAGCAAGCAAA
 CGAGCTTGAATAATCCTTAAGTANGSTTTATGTGCTAT

5

10 SEC N° ID 55

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
 arriba del gen P11Q de *Moraxella catarrhalis*

CAACTTGAAATCAGCTCAATGCTCTGCCAAGCACAGCACCGATGAGCGAGATTATGGGA
 ATGATAAATACCAAGCACAAGCGGTTAATGTGCAAGTGGT&AGTGCATCAGTTCAAGCA
 GGTGCTGAACAGGATTATTATACCGAAGCGCCTATCGCAGT&AGTGCAGCACAGGGAATTAT
 CATGCTTTGGGTCGATGTTTACTTGAAGTTGTGAGAGGCTAACCATTTCGTGACAGT&CAT
 GATTTTGATCTGAAGGCTGGTTTGAACCATCAGCTGATGAT&ATTTGTTAGATGAAGACT
 TATCAAGCGCAACAAACGCCCAAAACCAAGTTGCTCAGCAGGTGCTTGATGTTCAATGAATA
 TTATCGGTGGGGCATTTGGGTGCTTGCATTTGGGTTGGGATTTGGATGCTGCTGATAGCAC
 CAGTCAAGTTGTTGATGATAAGCTTGCACAT&TTACCATGAAGAGCGTATGGCGATCAG
 TGAAGCTGTGGCGATACCTTATCTGTGCGGATGATATATCAGCAAGGCAAGATCCTTT
 TATCAATCTTATAGAAATGTTGAAGTTCTTGATACCAATCATGCGGCTGATCAGCAAGA
 TGAAGCAAAACCGAATCTACCAAA. CTTGGCCTATGGCAGACACTATGCCATCTCAGCC
 ATCTGATACCAACAGTCTGCCAAGGCTCAGGCACAGTCTTCAAGGCGGATCCGATAGT
 CATTGATACCAACCGTGTTCGA. AGCCCTTAA. AAAGCTATGAGTTATCAAGCCTACGCTA
 TCATGGTGGTATTTTGGATGAT. TTAGACTT. GGCACCTATTATGAGTCTTGATGGCAT
 CGTTGATGCTGTGAGTACTGGACAATATCTTGGTAAATACCGGAAATATACCATAT
 TGAAGTGGTACGATACATCTGATTGAAGGCGTGGCTGATACACAAGGTGGCTATTATGG
 CCGTGAATGAACAT&CAT. TATT. ATAAGCAATGACAC

15

20

SEC N° ID 56

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
 arriba del gen lipo18 de *Moraxella catarrhalis*

25

TTGATGCAACAAGCGACCATCTTGGCCGATGATACCATGCTGCTCACCTAAGAAAATCAG
TTTATCAGCTTGCAGGGCAATGGCTGTGTGTCAGTGTACATCTTCTGCCAATAGATTAAA
AATTTCCGCCCGTAACCCAAJAAACCTGTGGGTCTAGTACGACAAATATGCTATTATCCAA
ATTATGGGGAAATGGCATCGACATCAATTGAGCGTAOCTCACCTGTCAATCTGATTAATCCAT
AGCATCTCTGATGCCGTAAAGGGCGAGCGGTGACAAAATTAACCGGAATGGCATCAATACG
AGATCCGTACATTTGGGGAGTTAGCAAGCCCCATCGACAGCCGAGCTTCTGATTTGTAGACG
AATTGAOCCGACTGCCCTCCAAGATGGCAGGCCATAGATCA7AOGGTGTACACGCCACATT
CTCATGTAGGTTTGATATCAGCTTGGGATTTTGTAAATTTTTCACCTTGTGGGGGTAC
AGCATGCACAAGCAOCAAATTGATGCCCAAGCTGTGTAGCATGCCAAAATCATGAATCAG
CGTACTAAAATTGTACAGAGCGAGCGOCTCATCACCAAAACATAACCAAAAGGTTTGGCC
ACGATGGGTGTTAATGTATGGGGCAGAAATACGAAACCAATGCACAGGTGTGAGTGCAGG
AGTGTCTGTATAGGTGCTGACAGAAATCATGAATGCTCCAAAGAGTCAATGGGTGGTAAA
ATAAGAAATGGCGAACAATATATGGCGAGAGCGCTGTGATGTGGTCAAAATGCCATTAAAT
AAGTATCAAGATACCATCATACCATAGCAAAAGTTTGGGCAGATGCCAAGCGAATTTATC
AGCTTGATAAGGTTGGCATATGATAAAATCTACCATCATGTGCGCCAGTTTGAACATGT
GTAAATGATTACCATTAATTAACAGTCAAGAAATTCACACCCCTCAATCAGCTGTGTATG
CTTATGGGCACATAAACTTGACCAACACAGGATAAATTA

5

10 SEC N° ID 57

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen lipol1 de *Moraxella catarrhalis*

GGCATACTTTGGCCATGCTTTATTTTGGCATAACTGCTATAAGGCCATTGCTACTTTTAA
TCAATTTATCCATATGTCCAATTAATGTGCTTTATGTAAATTAAGGCACACTATTAACCTGTC
CCACTGTTAACTTCAGCATAAAATCTTAACAAATGAATCAAGCATCGTATTGGCTGTT
AAATGATAAGCTTATATTTATTTAAATTCAGACTAAATGATTGTAAATATGGACATATCAA

15

GGTTGAAATCAAAAATTTGGAGAGTTATGTACGATAATGATRAAAAATPBAACGCCATC
GTAGGGGTGTGTATACGGTGTCTTATATTTGCCATATGTTGGTCACTGGCTATATTTTA
TX (XGCTGGATTGGTGTACAGGATTTACTCGTGGGATACCTTGGCTGA TGGCTTGGATG
ATTGTGGGTACGATTTGCTGATAGAAATTCGATACCGATTTATTTGACCGTCTGGTTGGG
TTATTTCTATCTTTTGTGAAAAGGCCATAATTTGGTTATTTTTCACAAAATAATCAT
GATTTTCTTCTAACTATCTAAAATATCAATTAAGCTTAAATATGTGATATAAAGATGGG
CATGGCTAAGTTTTCGATTGCCAAAATCTTAATATCATCACTGACCAAGCTGTGTATGAT
ATCAAACTTTATCAAAATCTTATGGGTATATCAAGATATCATACCAATGAAATCTTA
GCCAATTTACTATAAAATCAAAATCATATGACTGTGATTTATATCAATAGATCAAAA
TCAAAAGCATGAGCCAAAGGTATGATGAATGAAATACAAAATTTGGCACATTTATGACA
ATCTAAATGTCCCGAGAACCTGACATTTCCCGTGAATTTGGTGGGATAGGGGTCAAGCCA
GNGCATTAAGCTAAATTTTATGTGGGCAATGCTGACTTTATTTTATTTGTGGCAGTT
GGACAAATTCCTGGTCTAATGTATTTATTTTANGGAGATAA

20

SEC N° ID 58

25 Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen lipol10 de *Moraxella catarrhalis*

TTCTGGTCTACATCCCAAACTTTTACACAAGAACAACACTAAAGACAGTGGAGCAGATGAGG
CTCAAAAAGGCATCTTATAGTAATTTGACAGTTAATTTTCGTCAAGTCTCTACAAAAA
TACACCATCTGTCGAAGAAGTTTGTAGCAATTTAAGCACAATCATTTTGGCACAACCTGC
AAGCAATGCTTCAGGCAAAATTTAGCTGCTGGTAAGATACTTGGGTCAATCATGCAATGCA
TCAACCCCTCTTGTGCTGCTTGAAGCGATAAGTTTGGCATCTTGGCAAAATTTGACCATGGT
TTAGACCCCTTGGCTGGCTTGTGGTATCGCTCCACATGCTGTAGAGTAGATATTGGCTCA
TATCAAAAGGGCGATGGAATGTATGGAATGGTCAATACTAGCCATTTGTAGACCTTTGTG
TCATCAGGCTTAGGCCATGACTCATTAAACCTTGTGCTGACCAATAATAATCAGACACAA
AGGCAAGTAGTGTGATGAATGGCAAACTGGCTGCTCCCTCAATATCAGCGATAC-CAAC
AATTGGCTTGGCGTGGAGGCTCAGGCTTGGGTGTACAGGGTCTCGTGGTGTGA GGGC
GGATTTCGACATGACGCTGACGCATAAATCTTGGCTTTGAGTGGTTTGGGAATTTTATOTA
AATAATCGGCTTTGAGTCTTGTGCTGGTTTT AAGCTTTCAATGGGTGATATCAGGCA
TGGTTCTTGGTAATCAAGCCGCTTCCATGGTGAATAAT A GCAATCATGGAAAAA
TGACCTGTTCATTTGGTGTATGATTACCGTTTGTGGTGGTTGGCACATATTGCAACCG
CAATGACTTCTCGAGCTGATAAATGGGCTCCATCAGGTAAGCAGGTAATTGATAGATGA
CTGGTAGACGAATATCGCCACCTCTTAAAAAATAACATCAGGCTATGACAGCTTTAT
CAATCGTTAATGTGTTAGCACAGCAATAGGCGTTGGCA

5

10 SEC N° ID 59

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen lipo2 de Moraxella catarrhalis

TAAATGACCTTACAAAATAAAATTATATGTTCAAAAATGCTTAAGTATTGAAAAAGC
TATAAAAACCTTATCTATTAAAGCATAAAGATATTAAAGCATAAAGACGAGAAAAAGGC
AAGCGTCAATGATGATATTTCATATAAAAACCTTATGAAATTTTCAATTTTATGCAAT
GATTGAGCTTGGCTATCGGTGGTCAACTTTGGCTGCCAAGACATCGCGCGCTTTTGA
AATCATCAAAATGGCAACAATGATGATGTTGAAATCCACTTGACATATACCATGTTGG
ATGCTCACCATAGTTAATCGCAAGGCTTCCCAAGCCACCAACCGCAACACCACTGGCAT
TGCAGAAATACCAATCAAGACACCAAGGTCATGTGACCGCATTAATCAAA/ TGGGAG
GCTTTGAGCAAAATAGTATTGCTGACAACCTGGCAATGGTTGCCACCCATA.ATTTGGC
AGCTTGGGTGAGTCTGTGGGTACTTCTAATAAAGCAATTGGCACTCAAGCGTGCAAAAA
TGGAATTTGCTGCCACACTCAAGGGGACGATGG. GGCTGTTGTGCCAA. GGTGTTGCCAC
CAAAAATGCTGACCTGGCATGAGAATAATGAGCAAAATAATAAAGGACGGAGGGGAC
AATATTAAATAATACATCCAAAATTACAAATACACTGGGATTTTCAAGGATAGCGCTTT
ATCGGTTAAAAATGCCAAAAACCTATC. TAGGCCAACCACCAAGCGATGGCAGTGGC
AGCAAGGCCCATATAGATGGTTTCCCAACGAGATTGGGCAACCATCTCCACATTC- TUG
GTGATTTTCACTGACAAATTTGTGAGGATTTCAATTCACATAGCGGATTAATCTCAATAT
TGACCGGATGGGTGTTAAAAATTTCTATTGCTTGCATGACCGAGGTGCTTCACCGATAA
GGTCAGCAATGGTAAGGCCAAATTTTATATCACCTGCATAA

15

20

SEC N° ID 60

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen lipo7 de Moraxella catarrhalis

25

AGTAAACAATG TAACAAATACAGCAGTGTGGCAGTCCCTCAGTACGATGATCTGAAAT
TTGAATATGCGAGGATTTTGGATACGATTTGTGGCATGTC TTGTGCGATAATTTAATTGITA
TGATTATAATTGCAACCGTATTTGGTTTTATAATTATCAGCAAAATGATGCCATGCCCTGCTG
ACCAAAATACCGTTTATAAGTGT TGGGATGCCATGCC TTTATAAGTCTGGGGATGCTATCC
TAAACTTAGTGATGGCGCGCGGCTTCTTTGGTTTTGGGTAATAAAAGGTGCAACACGAG
CTAAATGCTCTTTGGGCTGCAAGTCCGTGATGCCAAAGCAGGGCAATTTATCAGTGTGC
CAAGGCCATTATTGCGATATTTTAATTATCTGATTTCA7CCGTGATTTCTTTGTTGGGAC
TTATTTGGGT7GGTTTTGATAAGAAAAAACAGGCTGGCATGTATAAATTTGCCAAACTG
TTCTGGTAAACGCAATTCGCTGATGGCTGCCAGTTAAACAAATAAACCAATCAAAAGCAA
GCAGGGCGATGTGTTTGAGCAGTTGGCGG AGATAAGCTAANACAGCAGGCTATGAAT
TATTTAAGCAACTTTA' CACCCCATTTGTT JG7GAGATTGATA7TATCCGCACAGCC
TTTGGAGCAATGCGAC''TTTGTGTCAGCCAAGATTTTACGGTATTGTTGCAAGTGC
TAGCGGACCAAGTTCTGTATGTTACAGGCTTGAGAGTGT7TACCTCAAAAAGCAGGC
AAAAATCTACCGAACAGCAGAACGATTTTAAATCAATTATCCCAATATATTGATGATCC
ATACCGTTTGTATGTCATGCTTTTTCATTTGCTTGATGGATGAT7GAACAT7AATCGAT
AAAAATCGGTTTTGATTGGCTCAATGGTCTGTAATTAAATCAATCAAGCAATCCGTAG

5

CTTTACTATAAGATATATCCCAGTAATATGGAAACATAGCA

SEC N° ID 61

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen lipo6 de *Moraxella catarrhalis*

GTTTAGCTCATAAGCAGACCTTGTGCACCTTCGGCAACCGAGCATCAGGCCAGCAT
CAGCATCCGCAAAACCCATCATGCCATCAATTTGGCTGCTGAT7GATATACCCCA
CCAAAGTAAGCGCTTAAATCGTGGAA7AACGCC7GCTGGTGAAGGTGAGGCTTCAGGCA
AAGCCAGGTAACTTATCCGCCACTTAAGTCCCATGCTGCGAGCAATGCACTACCTA
ATATAATACCAACTCGCGATATGTAATCATCAAT7GCTTGGGCTCATATGCTCAT
CAATGATAGAACTTGCTTTTGTATATCAGGCTCAATGCCAGAAZENCATTCAGCTA
CTTGACCTTCAGCGGTTAAGATACCTTCTAGTTGAAT7AAGCGGCAACTGCTTGCACTT
CTGGATTTGCAATTTGATTTTTCGGCAACTTCTTGCCAAATTTGCAAAATTTCTGTTG
AGGTAACTGCAAGCTTGAAGCCACCATGCCAAGATGGTGATTTAA7TTCAGGCTCAAGC
CATTCATGACCGCAAAACCGTGA7AAGCACTGCAACCCCAAGCGTAAGGCCAATGGTTG
AGATAAAGAAATAAAGGAAATAGAGCCATTTTACCGTTAGCTTTGATATATCAAGCC
CAATAAATAAGGCCAAGGGAAGCAACATATAGCTGCTTCCAAAGCAAGCCATGCTAG
TTTAGCACTTTT7TGGACAAATACCAAGCATCAGATANCAATGAATCATCAGGTTCGTT
TTGT7CGCTTGTATATCTGATGATAAGTTTCTTGCTAAGCAAGCTTTTATATGTCAGA
ATACA7AAAAGGTATATACTTATATTTTAACTTAAT7AGATCTGCTTTT7ATAACGA
TGATTGGCATGAAGTTTATCGGCTGATATGCTGGATATAAGTTTATCGGCTGATATA
AATTTTAATTAATCATCAATTTT7AAGGAATTTATCATTA

15

20

SEC N° ID 62

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen P6 de *Moraxella catarrhalis*

25

TAAGGATACCGAGATTTTGGCTTGTCAATCGTGTGTTAATCATTTGTAACGGTTFATAGTG
ATTGTCAATTAATAAGGGTAAAAAAGTATTTATCAAGTAATAATCTTTCTTATATGTGA
TATAATGACAAATTTATCAGATTTTACAGGATTTTATCAACATTTAGGATATGTCC
AGCTTAATTTATTAGTATGAGCGGTGTGATTTTGGCATCGTTAAATTTATGATGCTAA
AATTTGCCAATGATTAAATTTTGGCTAACATGATAGCCCGCTTTGGTAGGCTTTATTGGT
ATTGATGAGCAATAATAATATACCGAGTTAAATGGATTAACTTAACATACGCCAAAACT
TAACACGAAAGTAGATGATTATGACAGATACAGTACAAAAGATACACGACAGTCCDC
CAAAAAGTTTATCTAAAGACTACACGCCCGCATATATGAGTTAATAAAGTGGATT
GGATATCGGCTTGTTCATGATCATGCTGTGTGGTGGTCCAACTTAAATGACAGGAGC
ACACCGAGGCGAGGCTTCGGCTTCCTGGGCGAGATTAAAGCTTAAAGCATTACCTAAA
TGCTCAGGATTTAGAGTCCAGGCGTATCATCTTGATAAGGAAGGCTTAACATTTTAGA
TGACCCAGATGTGCGAGTGATGAGACATTTGGTGGATTTTACCTCAACACACACAC
ACTTGAGGGCTATATCAAGAGGAAACAGGTGATGATAAGATGTTTGACACAAATGCGA
ACCTGAGGCTTTTCCGCAAAATCACCTTTTCCCTGACCGCGCTGATGTTTGGACAGAATA
CAACCACCGCTAGAGGACCAAAAGATTTTAAAGCTTGGCTTGCCTAATGGTAAATTTGGT
TGAGTCAGGAGATGTGGATGAAATCCGCTTATATACCATTTGGCATGATCCTACCAAAA
ACCCAGCTATCTATTCGGCGCTGTCTATTGCCAATCTAGAAG

5

10 SEC N° ID 63

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen MshB de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

AAATCAAGCGCTGTGCTGCTGGTGAGTGGTTGGGAGAGGAATTATATCTTGGTTTGA
ACCGCCAAAACCGGCACTTCAGTGAGCAAAACCTAAAGTTACACCGGCTGAGCCGTTTTT
GTGCCAACAGATTTTGAACCTCAGCGAATCGGAGAGAAAGTTAGGATAGCATTTGAGGTAA
ATCAATATGGATATCGGCAATTCATCTTTTACCAATATTTTCTGTGTGTGTGTGTGTGT
TCATTTATCGATGCCAATTCCTGGCGGTGGTGGATTAATCACCATTTCAGCGGTACTCATG
ACAGGATATGGGAGGAGCAATGGCGTTAGGACCAACAAATTCGAACTATGGGCGGTGCA
TTATCGGAGGCGCTTATTTCTTGGGAAAAGAGCGGCTAATTTACGATATTTGGTTT
ATTTGATTTGGGTTTTCTTAGGTTCTGCGCTAGGTACATTATTAATCAATCAATTGAC
CTGGCGATTTTCAAAAAAATGCTTCTTTTGTATTTTAGCCATTGGTCTATATTTTTTA
TTTACTCTAAATTAGGTGATGAGATCGAAAACACAGATTAAATATCTGTATTTGGT
CTTTAGTTAGCCCATTTTGGGTTTTATGATGGCTTCTTTGGGCAAGGACTGGCTCA
ATCAATAGTTTAGGCTGTGTATCTTCTAGGATTTAATCTCCGAAAGCGGAGCAGAT
CCAAAATCATGAACTTCATTCGAACCTTGGCTTCTTTTGCATTTTCTTATTGGGCGGA
CAAAATCTTTGGAAAGTGGGTTTCTGATGATGGCTGGGAGCATTTTAGGTGCAATTTA
GGTCCAAATGCTGATGACGAAAGGTAAAGCTTGATTCGACCGATGGTTGTTATCATG
TCCTTATGATGACAGCTAAAGTGGTTTACGATCAGGGTTGGTTTCATTTTAAATTCGGA
AGGCGCCAAAAGTACCTTAAATTAATTACATTTTATTA

15

20

SEC N° ID 64

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen HtrB de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

25

TTGAAGTCCCAATTTACCCACCAAAATTCCTGGGCAAGATTGGCTAGGTAAACAGATT
CTTCGAAGAACGTCATCTGCTAATGTGGTTGCTAATACATTAATGACAGTGTACCGG
CTCCCTGACATCAACACATCTTTTGCAGCGGTTGGCAATGATAAGGCTCTTGAATTTG
GGCGTAATATGTCATGCTTTTTCGGAACGCTGACCAAAAGTCCGGTTAATCAATAT
CAGAAATTAATTTAAACCTTCTTAATATCTCTCTCTTATTACATTTACCTACAA

CGGCTTCAAAATTCAGACATATGGGGTGTCAATAATGTAGCCCCACGATAAGGTTCAAAAT
CAGTTGCCCTTTGGATC A"CAACACAGGCCACATCGCTTTGGGTGCAATTTGAAATCATTT
TCGACACATCTTAAGC"CGCTTTGC"UTAAFLAGAAGAATCAAGGACCGTAATTTT
TCAGGCACTTTCTAGCTCGCTAATAAATCCTTGCATCTACATTAATGAAATCTTCTT
CAAAATCAAGG" (AAG"AGCTGT"CATGACGAGATAAATACCTAATTAATCTAATGCTTG
GATGGCTTCTAA"OCAACAAAA"TAGAATCAATCTTTGT"TTTCTAATAGTGGGAA
GTGAGAACTGTCTCATCTGTCCAAATCAATCCCAATTAAGTGAACGGGTACATTTGATG
AA"CAATATTTCATCGCCACATTTGAGCACACGCGCGCGCTTCTTATTTCTTTGACGC
GAA"FACTGGCACTGGTCTTCTGTGGAATACGGTGGTTCACGCGAATCAATTAAGGAT
CAAGCATCAGATCGGCTAATACAACTACTTTTGTCTTAAATCTGCTGAATATTGAG
CCATTTAAATCTCTTATTGAATAACCAAAATTTGTGCGATTTTACCAAACTCAAA
TT"AC"ATAAAC"ACGCCCTAATCTAGCTGGAAAGAACAA

5

SEC N° ID 65

10 Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen de la proteina D de *Haemophilus influenzae*
(H1Rd)

AGCAATAATTATAGCTGCAATATTTCTTTAAAGATGAAGAGATCGTATAGACAAAAAGA
ATTTTATATTGGAGAAATTATAGCAATTAATGGTTCCCTAATATTGGTAAATAGTTTC
AAATAATGATCGAAATACAGACTTTTTC TTGGGCAATATTTCTTTTACAGCTATTTT
TATTAATCTGTACAGAAATTAATTTGTAAGAAAGTAGCCAAAAGATAAATGCTGTGT
AATAAGTGCATCGACAGCAACAATTTCAAGGATTTATTTTATCTTTAGCTTTAAZAC
TAAACAATATATTTATTACAGATGTTGGCAATGCAATGCTAGGCTTTAGTTTGGCG
TGGCTTTTATGGGATGCTAACAGGATGTTGATGGCTTTTATATTCTTCAAAAACAGGG
AATCACTGTTTTAACATTTTGCAATTTATTAATCTCTTTCACCTCGGATAATAGCTTA
CTTAACATTAGATGAAGAAATAATATCTATCAGGGAATTAGCGGTATTATTTCAATTA
"GG"GTCTATTGGCATTAAGAAAGAAACAGGAGTGTGTATATAAA TAGATCAT
GTTGGTGAATAGGTATAGTTAAATATCT"TTCAATTGGTTTATTAAAG"CTTTAGCA
ATTCTCTATTTAAGTTTATGTTGAATTAGATATTTTGGGAAAGATGGACAAATTAAGC
TGTAAATAATGCTGAACATATGAACTATACCAATCTCAATAAATAATATTCTGCTG
GAAATGATTATAAATCTCTAATCTAATCTGTAGAGAGGATATCACTAT"AACTA"AAA
GAATGATTAAAGCCATTAAAAATATTTCAATTGTATLCTAATAATCA"CAAGCTAT"TA
CAAG"TAAGAACATCTTTAGAACTATTAAATATTACGGGAATATTAATTTCTGTTA
AAATAG"TAATGATCCTAACAAATATATAAG"AGAAATAAGT

15

20

SEC N° ID 66

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen H1n47 de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

18

TAAATACGCCAAATTAATTCAGATACGCTGGCTCTTAACGACAAAAAATAAAAAAAT
GTTCATATACAGGAGAGCAATTTATCTTTTAAAGGAATC...AGCAGTACAAAAAGG
GTCTTTACAGTAGCAAAATTCATATAATTTATCTTCTAATACCGCCJATTCTTCTAGTCAAT
AAAGAGGTCAAAAAATGAGCTGAGTTAAACGAAATTTTAGTAAAAGTCTCTCTCTTCA
CTCGAAAGGCCAATGTGCCAGAGCGCTA...GACAAAATGTACTGCTTGTGAACAGTAC
TTTATAGTGAAGAACTCAACGTAATCT...TATGTTTGGCCGAAATGTGTCAATCATATGC
GTATTGATGCTGTGAGCGTTTATTAATTTATTTGGACGAAGATTCAAGCCAAAGAAATTC
CGGCAGATTTA...AACCAAAAGATATTTTAAATTCAGATTTTAAAGAAATATAAGATC
GTATCAAT...CGGCCCAAAAAGAAAGCGGCGAGAAAGATGCGCTAATTTACTATGACAGGTA
CACATTATAATATGCCAATCTTTTGTGTGATCGAACTTTGCTTTTATGGCGGTTCAA
TGGGTCTGTAGTTGTGCAAAAATTTGTTAAAGCGGCTGAAAAGCGGATGGAATGAAT
GTCCATTTGTG...GTTTCTCTGCGAGTGTGTGTGTGTGTATGCAAGGAACATTTATCTCT
TAATGCAAAATGCCAAAAACTAGTGGCTTACTTGTCTAAATGCGTGAAGAGGTGTGCCAT
TTATTTCAGTATTAAAGGATCGGACTTTAGCGCGGCTATACGCCAGTTTTCGATGTTAG
GGGATTTAAA...ATTGCCGAGCCAAAAGCCTTAATTTGCTTT...CAGGGLCAGCGGTATTG
AACAACTGTGTGCGTGA AAAATTTGCCAGAGGTTTCCAAAGGTAGTGAGTTTCTACTTGACA
AAGGGCAATTTGATATGATCCTGAAAGCTTCAGAAATGCGT

5

10 SEC N° ID 67

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen P5 de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

TCACCTTAATTCAGCGCATCAATGTTTCTAAAACATCAACAGATTGACCGCACTTGT
TCTAAAATTTGGC...ATTATTAAAGACTGCGCGTAATGCCAAAACATGATTAGAGGTTT
CCATATTGGCA...CAGGCTTGCCCGAGGCGATCGGTGTTAATCATTCGACCTAAAGTGGT
CGATTGCTGTGGACAGTTCTGGGGCAAGAAACCAATGATTTTAAAAATTTGATTA
AGTTGATCTTTTACTACGCTGCTTTGTACTCGGAACCCAGCGTCTTTTTCAGATTGATCT
AAGATGGCTGTGATATGACCGAGAAAGATCTGATATTTGTTATGATGGATTGCGCA
TTTGTGCGAGTCTCTCCAGCGGAGCGCTTAAGCTGATTTGATGATATTCAAGGTAAATTT
GCCAATTTTGTATCTCCGACTATATCAGCAAGCCGTTTTCGAAAGAAATTTGCTTGTGCA
AGTTGTTGTGTAAAGCTGTATCTGCTAGCCAGACTTAATCTATCT...ATAGTTTGTGCGCA
ATATCCCGCTCAAAATCTTGGCATTGAGATCATCAGATATCAAT...ATACATATTGTTCA
ACTTCAGGAATCGGATTTACATTTGGCAGATAGTATTGACCCATTAAACATATTGACA
TGGAGCTTTGATATATCTTAAGCTTAGAATATGTGCAATTAGGAAGAGAGAGGAA
ACTAAAGTC...TTAAGAAA...TTTATTTGGATAAAACTAAACAAAAATTCAAAA
GAATTCATCTTTTCAATTTTATAGGATAATAAGCGCACTTTTCAACGTTTCTTTTGGGG
TAACATATAGCAAGGAATTCGAATTTGTCAAAGCTAATAAGTAGCGCAATTCNAAC
CCTAGTTAAGTCACTGTTATATATGAGCTTTAATTAAGTTTCAGTATAAACAGGACA
CTTTTATTACTATTGATCACTAAATAGAGGACATCAAA

15

20

SEC N° ID 68

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen D15 de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

TCGATTGTATCCTATATAAATATAGACGTAAAAATCATTAAATATGCAACACCGGT
AAGCTTAATAACAGTGTGCGCAATTCGATAACAGATGCTTTGCAACCGCTCAGAAAC
GGTTTTCCTTTAACAGCTTCCTATGTTAAAAAACTAAATGACCGCCATCTAATACTGT
AATGGAATAAATTCATAATCCTAAATTTACACTAATCAATGCCATAAACTTAAAAA
TACACCAATCCAAATATTTGCTGATCG G CAGCADCCTTTGCAATAGAAATTTGCCACT
AAATTAATTAATGACAAATGCGCAGTAATTAATTTCCCTAATATTTTCAAGTTAAAAAG
GAAAGCTGTCTGTTTTTCAATGCCCTTTTGTAAAGATTCAAGAAATACCATATTTAAT
TCAGTACGGTATTCATCCGCTAATTTGTTAAGCTGCGC"AAACCCCAACAAACATTG
CCATTTTGATTACGCACTGGAGTTAGGACTTTGTCAAATCTTTCTCCATTACCTCAACT
TTAATAGAAAAAGATTGCGCTTTGTCGACCTGTTTATAAAATCTTGCCAAAGGAAGTGG
GTTAAATTTCTTTTAAAAATTTATCACCCTTTGTTAAACAGCTTTCTCAGCGGGAGAA
TTTGAACAACCTTTAGAAAGCACCAATTTCAATTTTAGGACCATAGGCATAATCC TAAT
GCCCTCAAAAGCACTTTCTTTTCAGGATCGAATGTCCAATTTGTAAGATTTAAAGTCCGT
TGTTGTTCAATATTAGAAATTTGAAGGAGAGAAAGCTAATCTCAACATTAGGCTCCCGCAT
TTTGTGCCAAGTAGCATATTGATGGTTTCCCAATCTTGAGTTTCTTGCCATCTAATGTA
AGAAATTTGCGTATTGGGTTCAATGTGGGCTTGTGCTGGGATTGAGTTTGGTGTATTGAT
TCAATCACTGGTTTAAACGTTGGCATTCATAAAGGTAAAT

5

10 SEC N° ID 69

Secuencia de nucleótidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen Omp26 de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

TTTGATAAATATCCTTAATTAATGATGGGTTAATATTTCTGCGCCAATTAATTAAG
GCAGAGAACGTTGTTTTGAGTTCTGATGAAGAAAAAGTTCAATTTATTAGAAAGAAC
TCCAACTACTAATTTGGAACGTTCGACATCATATTTTCATATTTTAAAT"GGTTTGGC
ATAAGAGAAATACCAATGGCCCAATAGGAGATTGCCATTGGGAATCCGACACCTGTAGAGGC
GCGAATACGGCTTGATTTGGCATAATCGGCTAAGCTTTTAAATACATTTGTTATCTAATC
ACTCTTATCCGATTTCCTACTTAGTATTCCAAACACTTGCCG.ATCAACAAATAGGGAGGT
TCGCACTGTATTTGGCTTTATCACTCACAAACGCTGTTGGTACAATTAAGTTCTGCACCT
CGCAGTTGTGATTGCAATTAACCAATCAATCAGAACTTATCTCTCTTAAGATACCAT
ACCATTAACATGTTCTGCATAAATTTGGTTAGGTCTAATACTACATTAAGCAAAACACG
TAATGAACGATGCGACCCGCTGTATAAGTTTGATAGAACCGTAAACGCTTGTTCCTCAA
ACCATTTGCATATCTCTGAGATGCTTTTGCAGATACAACCCAGAGGTGATCTCTGTCTAA
TGGGTAGAAACCGCTGACGCTGACACTTAGTTTGTAGTATTGTTATCAGAACTGCLAAT
AGTAACCTGCTCCACCAAGACTTGCTTTAAACCCCTTAGTTGGGAAATAGCCCTATTAAG
GCTGTTATAGTTCCAAACCAAAAGAAAAATCAAGTCAATTTGTTTAAATGCCATTACCTTT
AAATTTCAATTCATTGAATATATAAATACGGTTATATTCAGAGCAAAATTAATTTT
A"ATAGGTATGGCTAATCTACATAATAGGAGTTATTTTCATTTACAGGGAACCTTA
AGTAACATTACTTCCATAAGTCGTACGCTTATAGTTAGAGG

15

20

SEC N° ID 70

Secuencia de nucleotidos de la región de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen P6 de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

TTAGATTTCCTCAATAGCTTTTATTATAGTTAAGTATGAGACCAAGCTGGAAATTT
AAGTCAGCCACCACTCTCGGAAGAGCTCGCCTTTAAGGCGACCATCTCCGAAATCAATTT
TAGCCATCTTTCTAAGCCCTTGTTGAAACATAATAAATCATCAATTTTATTTCGAGAG
CTCTGGCGTTCTGGCCTAGAAAGAACTATCAATGAGTACCTCTGAAGACGGCCGCTCTGCAGTAT
TTGTTTAACFAGATATTGTTTACCAATTGAATCAACAGTGTGTTTCCATCTGCAGCTAAAT
TTGTGCGCTACCGGACCAACCGGCTGCTGTGCATCTACCGCTTATATGCAATTTGCGTAT
AAGCTCTGGCGGACCACTCTCTATCGGATCAATAATAAATGAATTCCTGTCTGGGACACA
CTGCTGCTTCAGTATTATPACCGGCAACCACTGCTCAATTTGAGTGAAGTCTACCGCATTTGC
TCCCATACGCTAAATATTAGAAAGCACTCAGGAGAGAAGCAAGAGCTTACCAAGAGAGG
ATCTGGGCAAGAGCTGTGGGCACTATAGCCCTTGAAGAAGTGCACATCTTACGTGGT
CGCAGAAATTTAAATCGCTACCAACAGTGTGATTTTATTATCAAGCTACTATAGGC
CAAGCGCTGGCGCTCTGGAGACCAAGCTGGAGACATAATTCGTTGGGCACTACAGCTTGC
GATAAATGATTATAGCACTCATAAATCTGCTACAGCAAGTCTATAGAGTTGGCAAGCGG
ATTTTATTTCACAACTAAGCGGATACGATCTCTAAGAGCGACCGGATCGGATTAATTT
TGGAAAACACTCATGCTCAAGTATCGGCGCTACAGCTAACCATTTATTGTGATGCT
ATAGCTATTTTGGCATTAACAGTCTGCTCGGCTACCTGATCGGACCAACCGCTATCAATTA
TTGATAGTAACTACTAATCACTACCGCGTGGAAACCACTT

10 SEC N° ID 71

**Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen TbpA de *Haemophilus influenzae* (no tipificable)**

GGCGATAACCGAGTTTTGGGGTATTATGTCGAAGAAGCCACAAAACCCAAATTA
TCAGAGAAGCTTTAATGTTGGCGAAGCTACTACTTTAAAGAGCTGATGCAAAAACC
AATCACACGCCGATACAAACCACTATAAACACCAATTAACCTACCGATGAAAAAAC
TTTAAGACGGAGATATACTAAGTTTGGTGAAGCTGATTATCTTTAATTGCAANTCAG
CCGTGTCGCTTTTACCTGAAAAAATCTGATGATTTCATTAAGTAGTGGGACTACTACT
GTGGGAATTAAMCGCTATAAAGTGGAAGCATTTGCAAGACCTAAGCATGTAAATTT

GGTATGCTATTATGACACCCACCTTAAAGACAGACAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAC
CAGAGAAAAAGAAAAAAGAAAAACACGACGACACACTCTATGACAGCTATTATCACT
TCTCTATTAGGTGACCGGTATGCGACAGCGCCACACFACCTGACAGGAGAAAGCTGAAATAT
GGCGCTAA-TGGGTTTGTTGTTATTTGGTATGTCGACGAGACA-CTTACTCTACTGCGGAGAT
AAAAATCGCTCTCGCGGAGTTTGATGTAAATTTTGGCGATAAAAAGCTTACACGCGGATATT
AAGACGACAGCTATATGGAAATACCGGTATTTTAAAA-TTCTCGACAGAGCTCTCAAGTGCTGAG
AATGACCTTCAGCTGTCAGACGACGACGACCAAAATTTTGTATATGTTGTAACATATGTCGAA
ATTGTCGATATGACCAATAATATTAACCTGGAGTAAATATGG-CA-TTATTATGGACGCTAT
TATGATGATGACGACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AAGCTACTGCTCAGCAGCCAAATTCACCAAAATGTCAGAGAGTCGAGCTTGCTGTTGGAGCTAAA
AGCATACAGCTGACAAACACGAGTATGCTGATATGAAAT

SEC N° ID 72

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen TbpB de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

TAGAATTATATCTTATACAAAATGATAATTGTTGGCATTATCATTTTCTTTTGTAAAT
AATGTCMACTTATATATTTTAAAGTTCAATGGATAAAATATGAAAAATGGCGTAAAAACAGC
TTTTCTCTTATCATTAATAGCCTTATCATTAACGAATJTAJCTGGGCGAGAACTTGCAC
GTCTTAAAAATGATACATTGACAAAATACGAATTCAAAATGGGAATTAAAAACCTCTCTCT
TTTTCTCTATGCCATAAGAAAGAAATACCAAAATAGGCATATTATTCTCTTTCCAAAAGCC
AATTAGCGCAGCATCCAAAGGTTTGTATTGGGTGGGTAAATCTCTCTTTATATCAAAAAT
ACACTCAGGCAGTTCCAAGTGTATTACCACTATATAAAGAAATTCCTCAACAAGATAATT
TCTTACTAACTTGGGCAAGGCTATTGAAGCTGTGAACAAAGGTGATTTAATCAATCTA
TTGCTTATTATCTGGAATTATTCTCTCGAGAGGCACTTTTACTACCTTTACGTTATTAAAT
TAJCTCAAGCTCTATTTTTAACTATGAAAAATGAAGCTGCCAAAATTCRAATTTGAAAAAT
TACGTACAGAGGTAGATGATGAAAAATTTTTAGGTGTTATTGATCAGTATCTTTTAAACAC
TAAATCAGCGGAATCAATGATATGCGCAAGTAGGATTAAATTTTTAAATGATGATAATT
TGAATAACGCTCCAAAAGTGGCACAAAATTTGGTAGTTGGACCGCTTGGGAAAAAGAAA
CTGGGCAAGGGGTAGGTTATTCTTTATCAGTAGAAAAAAATGGCCATGGGAGATCATTT
TTTTTAGTAAACTATGTTTAAATGGGAATGGAAAAATATTATGGGATAATAAAAATACA
ATGAGGCTACTGTGGGTATAGGTGGTCTTTAGGCTATCAAACTGCCCTCAGTTGAAGTCT
CGTTGTTTCTTTTCAGAAAAAGCGTGTATAGCAGGGGT

5

10

SEC N° ID 73

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen H1fA (pilina) de *Haemophilus influenzae*
(serotipo LKP, genoma 1)

TAAATAATTGCTCCATAAAGAGGTTTGTGCTTATAAATAAGGCAATAAAGATTAAATATA
AAGCGTTTATTAATAATGCCAAAGGCTTAATAAACAGCAAACTTTGTTTCCCAAAAAAG
TAAAAAATCTCTCCATTATATATATATATATATATAAATAAAGCCCTTTTGAATAATTT
CATATTTTGTGAATTAATTCGCTGTAGGTTGGGTTTTTGGCCACATGGAGACATATATA
AAGATTGTAGGGTGGGGTAAAGCCACGGGGAACATCATCAACAACCTGTATGTGTGT
ATTAGGCAAGGTGGGCTTATGCTTGGCTACGGGGAATGAATAGGATAAATATGGGCT
TAGCCGATTTAAGGATTTAATGTATGTGAATGGGGAACAACTGTTAATAAACAATCT
TTTTTTTTTACCGCACTATTTTGGCCGCACTTTGTGCAATTTTACGCCAATGCAGATGT
GATTATCACTGGCCAGCAGTGTATTTATCCGCTGGGCAAAAAATGTTATCGTGAAGTT
AGAAAAAATGATGATTGGGAGCATTTGGTGCAGGCTGGATGATAATGGCAATCCAAA
TGGCGATCCAAATACACCAAAAGCCCTTTTGTGATTACCCCTTTTGTGCTCGAGTGA
AGCGAATCAGGGCAAGTTTGGGATTAGGTTACAGGCGAGGAGCCCTTACCTGATGA
TGGCAAAAGCCTCTTTTATTTTAAATTTGTAGATATTCGCGGAACCTTATGCTTTA
TCTTCAAAAACAGGCGCTTTATGCAAAATTTGCCATTCTGTCAGTGAATGAAAAAGTGTATTAAAGC
TGGCCCTGGGAAATCTCGATGGATCTCTGTGATGCAATGAAAAAGTGTATTAAAGC
CACACCTGAAGGGGTGTTGGTGGATTAATCAAAACCCCTTATATATGAATACATTGGTTT
GTTACATCAAAATAAACCTGGCAAAAAATGCAAAATGCTTG

20

SEC N° ID 74

152

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
arriba del gen H1E (pilina extrema) de *Haemophilus influenzae*
(serotipo LKP, genoma 1)

TAGTAGATTTCGGCACGGGCAAAAATACAATGGTGTATTAACTTCACTTTGGCAAATG
O²GAGCCAGTGCCAAATGGCATCCACCGCACANGATAAGGAGGGGCAATTTGTGGGGATG
TCCTGCAAGGTGGCTGCTTTTTCGCTAATAAATTTACCCAGCCAAAAGGGGAGTTAATCG
TCAAAATGGGGTGAGCGAGAAAGCGAACAATGGCGTTTCCTAATATCAAGTTGATTGGATA
ACGCACAAATACAAAGTACGATATTCAATGCAAAACCGCAAAATCAATTAATTGAAGAGG
ATTAA²GCAAAAACACCCAAAAAATTAACCGCGCTTTTCCATCAAAAATCCACTGCTAC
TTGAGTGGAGCAAAATTATAGTGGAGCAAAATTATAGTGGCTCAAAATGCTTTAGGTCTCA
TCGTCGGCTCTGCTTGGCTTGGGTGGCTGCTTGAATGGCATTTGGCACTGGCTGCTTA
TGGTTACGATGGCAGAGTGACCTTTCAAGGGGAGATTAACTGATGGCACTGTAAUAY
TGAACAGACAAC²AAATCGCACGGTTA²CTGCCAACAG²CGAAAAGCTAATTTAAG
CCACGAGGGCAAAACCGCGCGCTTGGCTTTTCCATCACCTTAAAGAAATGCAATGC
AGATGATGCTATCAAAAGCTAATCTGCTATTAAAGGGGAGACACACACAGGGCAATC
TTATCTTTCCAAATAGGCAAGGCAAGGCAAGGCCACCACTCGCAATTCAAA²TGTCAA
AGCGGATGGCATAGGCAAGGCTATCAAGGTGGAGGGCACCGAAAGCCAAACAGCGAAAAGC
CCCCGACACAGGTAAAGCGCAAAAGGGCACAGTTATTCACCCCGTTTGGCTACTTTGG
CTGGTTATTACGCACAGGTAAAGCGCACCGCAGGGAGGTTGAAGCCACTGCAACTTTTG
AAGTGCAGTAACTAAAAATATTATTATCCAGTAAAAAA

5

10

SEC N° ID 75

Secuencia de nucleotidos de la region de DNA (1000 pb) cadena
15 arriba del gen P2 de *Haemophilus influenzae* (H1Rd)

1 TTATCCGCTA ACATTTCATC AGTAATTCCA TGAACITTA TCGCATCAGG
51 ATCAACGGGG CGATCTGGCT TAAATATAAT ATGAYAAATTA TTACCTCTGT
101 AACGACGATT TATTAAATCA ACTGCAACCA TTTCATTAAT GCAGTGTCTT
151 TCATAA²CGG CGCCAGCTG ATTCATACCT GTAGTTTCAG TATCTAATAC
201 AATTTCGGCA TTGGGATTAA TCATTGTTC AACCTATCTC TTTCATTAA
251 AATACTTGCC ATTCTACACA ACAACCTTTT TGTATGGCC AAACAGATTG
301 AAATTTTAC TGATGGATC TGCTTAGGTA ATCCAGGGGC GGGCGGAATT
351 GGTGGCGTAT TGCCTTATAA ACAACATGAA AAAACACTCT CCAAAAGGCTA
401 TTTCCAAACC ACCAATAATC GAATGGAATT ACGCCCTGTC ATTTGAAGCAT
451 TAAATACATT AAAAGAAGCT TGCTTGATCA CGCTTTATAG TGATAGCCAA
501 TATATCAAAA ATGGCATAAC CAATGGATC TTTAACTGGA AAAAAAATAA
551 TTGGAAAGCA AGTTCTGGAA AGCTGTAA AACCAGAT TTATGGATAG
601 CCTTAGATGA ATCCATCCAA CGTCATAAAA TTAATTGGCA ATGGGTAAAA
651 GGCATGCTG GACACAGAGA AAATGAATTT TGCGATGAAT TAGCAAAAAA
701 AGGGGAGAA NATCCGACAT TGAAGATAT GGGGTACATA GAAGAATAAT
751 ACAACTGATA TAACGTCAAT TTTTCGATA OCTAAAAATA TTTAATACTT
801 AAACCTAAAA CAGATAAAAA AATAATCAAA TTCAATTAAT AAATGTGATC
851 TCGATCAGAT TTCAGAAAAA TTAATAATTT GGAGTATTGA CATCAAAAT
901 TTTTTTGT AAGATGCAGC TCGTCCGTTT TGGCGATTGG ACAATTCAT
951 TGGAGAAAAG TTCAATCATA GATAGTAAAC AACCATAGG AATACAAAT
1001 "

20

25

SEC N° ID 76

Secuencia de nucleotidos de la region de codificacion de DNA
(parcial) del gen HtrB de *Moraxella catarrhalis*

158

```
1 TCAGTGCCTTG GTTPTTTAAG ATATGTACCG CTCTCAGTCC TGCATGGATT
51 GCGCGCGTGT GCGTCTTATA TTTCCTATCA TTGCAGGCTT AGTATTATC
101 GCAAGCATCCA AGCCAATTGA ATCTTGTTT ACACCAAGAT GCCAGACGCA
151 CAGCGGCAAA AACTCGCCRA ACAAAATCCTA AAAAATCAGC TCATCAGTGC
201 AGTCGACAGT CTTAAAGCTT GCGCAATGCC ACCAAATGG TCTATCGCAC
251 AATTTAAAC GTTTCATCAT GAGGATATCC TAAACAAAGC ACTTGCCAAT
301 CCAAGT JETA TGCTTGCCAT TTGGCTCAT ATCGGCACCT GGGAGATGAT
351 GAATGCTTGG CTCATACCT TTGGCTGCC TACTATCATG TATAAGGCCA
401 TCAAAATGG GCGGTAGAT CGCTTTGTTT TACAGGGCG TGAAGACTA
451 AATGCCAGCC TTGTACCCAC AGATGCTAGT GGTGTTAAGG CAATTTTAA
501 AACACTCAAA GCAGGTGGAT TTAGTATCAT ACTGCCGAC CATGTAGCTG
551 ATCCATCAGG TGGTGAGATT GCTGCTTTT TTGGATTAA AACCGTACG
60 AGTACGCTGG GGTCAAGCT TGCTGCAAAA ACTGCTTGG CTCCTGTTGG
651 CTTAAGCTGT ATGCGCTG AGATGGCGA TGCTTTGAA ATTTTGTGT
701 ATGAATTAAA TCATGAACAA CTTATTCAA AAAATACCAA AATTGCAAGC
751 ACTGCTTTAA ATCTGCGAT GGAACAAATG ATTTATCCAC ATTTTGTGCA
801 TTATATGTGG AGCTATCCT GCTCAAGCA TACACCCTA TTAATATATC
851 CTTATTACT TAATGAAAT GAGCTAAAAA AAATAGCCAT AAAGCTTCAA
901 GCCATGTCAA AGGATAGTTA TGAG
```

5

10 **Secuencia de proteínas identidad al 25% y similaridad al 35%
con HtrB de *E. coli***

```
1 SVLGFLRYVP LSVLHCLAAC ASYISYHCR L SIYRSIQANL ILVHPMPDA
51 QRQFLARQIL FNCLISAVDS LKTRAPPKRW SIAQIKYVH EDILIKALAN
101 PSONLAIVPH ICTWERNHAM LHTFGCTIM YKPIKAAVD RFLVQGRERL
151 NASLVPTDAS GVKATPKYFK AGGF911LPD HVPDPGGGEI APFPGIKTLT
201 STLASKLAAR TGCAVLGLSC IRRDGGDFE IPCYELNDEQ LYSKTKIAT
251 TALNGANEOM IYPHPLHYMW SYRREKATPL LNPYLLNEN ELKKIATKIQ
301 AMLPDSYE
```

15

SEC N° ID 77

20 **Secuencia de nucleotidos de la region de codificacion de DNA
(parcial) del gen HtrB de *Neisseria* (meningococo B)**

```
1 ATGTTTCGTT TACAATCGG GCTGTTTCCG CCTTGGCAA CCGCATGCA
51 CATGCTGTTG ACCGCGCTGC TCAAAATGCTT CTCCCTGCTG CCACTTTCCCT
101 GTCTGCACAC GCTGGGAAAC CGGCTCGGAC ATCTGGCGTT TTACTTTTAA
151 AAGGAAGACC GCGCGGCGAT CGTGGCGART ATGCGTCAGG CAGGCATGAA
201 TCCGACGCC AAAACAGTCA AAGCGCTTTT TGGCGAAGCG GCAAAAGCGG
251 GTTTGGAAC TGGCCCGCGG TTTTTCAGAA AACCGGAGA CATAGAAACA
301 ATGTTCAAA GCGTACACGG CTGGGACAT GTGCAGCAGG CTTTGACAAA
351 ACACGAAGGG CTGCTATTCA TCAGCGCGCA CATCGGCAGC TACGATTGG
401 GCGGACGCTA CATCAGCCA GCGCTTCGGT TCCGCTGAC CGCCATGTAC
451 AAACGCGCGA AATTCAAAGC GATAGCAAAA ATCATGCAAG GGGGCGGGT
501 TCGCGGCAA GGAAGAACCG CGCTACCA GATACAGGG GTCAACAAA
551 TCATCAAAGC CTTGCTTGG GCGGAAGCAA CCACTGCTCT CCGCGACCA
```

25

```
601 GTCCCTCCG CTCAGAAGG CGGGGAAGG GTATGCGTGG ATTTCTTCGG
651 CAACCTGCC TATACCATGA CGCTGCGGG AAAATTGGCA CACGTCAAAG
701 GCGTGAAAC CCGTTTTTC TACTGCGAAC GCTGCGTGG CGGTCAAAGT
751 TTCGATTTC ACATCCGCC CCCTCAAGCG CAATTGAAG GCGCAAAAGC
801 CATGATGCC GCGGTGTTCA ACCGCAATGC CGAATATTGG ATACGCCGTT
851 TTCGACGCA GTATCTGTTT ATGTACAACC GCTACAAAT GCCG
```

159

Secuencia de proteínas identidad al 30% y similaridad al 38%
con HtrB de *E coli*

1 MFRLOFGLFP PLRTAMHILL TALLKCLSLI PLSCILHTLGN RLGHIAFYLL
51 KEDRAIVAN NROACQIPDP RTVKAVFAET ARGGLELAPA FFRKPEDIET
101 MFRVHGWHEH VQQA...DXHEG LLFITPHIGS YDLGGYI9Q QLPPPLTAMY
151 KPPKIKAIKX IMQAGRVGRG GKTAPTSIQG VKQIIKALRS GEATIVLPDH
201 VPSPOEGGEG VNVOFFCKPA YTMILAAKLA HVKGVKTLFT CCEKLPGGQG
251 FDLHIRPVQG ELNGDKANDA AVFNRAEYV IRRFTQYLF NYNRYKMF

5

SEC N° ID 78

10 Secuencia de nucleotidos de la region de codificacion de DNA
del gen HtrB de *Haemophilus influenzae* (no tipificable)

1 ATGAAAAAGC AAAAAGTCCC TCAATTCAA CCGCAGTTT TAGCCCAAA
51 ATACTGGCTT TTTTGGCTAG GCGTGGCAAT TTGGCGAAGT ATTTTATGTC
101 TTCCCTATCC TATTTTGGCG CATATTGGTC ATCGTTTCGG TTGCTGTTFY
151 TCACATTTAA AAGTGGGTAA ACGTGGAGCT GCGATTGCAC GCGTAATCT
201 TGAACATTTGT TTCCCTGATA TGCCTGAAAA CGAACGTGAG ACGATTTTGC
251 AAGAAAAATCT TGGTTCAGTA GGCATGGCAA TTATCGAAAC TGGCATGGCT
301 TGGTTTTGGT CCGATTACAG TATCAAAAAA TGGTCGAAAG TTGAAGGCTT
351 ACATTATCTA AAAGAAAAAT AAAAAGATGG AATTGTCTCT GTGGGTGTTT
401 ATTTCTTAAC GCTAGAACTT GCGGCACGCA TCATTGGTTF ACATCATCT
451 GGCAFTGGTG TTTATLGTCC AAATGATAAT CCTTTCCTTG A-TGGCTACA
501 AACACAAGGC CGTTTACGCT CCAATAAGA FATGCTTGAT CGTAAGATT
551 TACGCGGAAT GATCAAGCT TTACGCCACG AAGAAACCAT TTGCTATGCG
601 CCTGATCAGC ATTACGGCAG AAAAAATGCC GTTTTGTTC CTTTTTTTC
651 AGTACCTGAC ACTTGCACTA CTACTGGTAG TTATTATTTA TTGAATCTCT
701 CGCAAAACAG CAAGTGATTT CCATTTCGCG CATTACGCCA TAAAGATGGT
751 TCAGGCTATA CCGTGAGTAT TTCAGC...T GTTGATTTTA CGGATTTACA
801 AGATGAAGGC GCGATTGCTG CCGGAA...CAA TCAGATCTGA GAAAGGAAA
851 TCATGAAGGG CATATCACCA TATATGTGCG TACATCGCGG TTTTAAACCA
901 CGTCCAGATG AAAATACGCC TAGTTTATAC GATTAA

15

20

Secuencia de proteínas identidad al 57% y similaridad al 66%
con HtrB de *E coli*

1 MKNEKLPOFO PHFLAPKYVL FWLGVAIWRS ILCLFYPTLR HIGHGFGNLF
51 SHLVGKERRA AIARNLELC FPMPEKERE TILQEMLR3V GHATITGMA
101 WFWDSRIKK NSEVEGLHYL KENKQDGI VL VGVHFLTSL GARTIGLHNP
151 G LVYRPNON PLLONLQTOG RLRSVAMNLO RKOLRGMIA LAHEETIHYA
201 PD40YGRUNA VFVFFFAVPO TCTT-GSYLL LKSSQ-SKVI PFAPLRNKG
251 SGTVYSISAP VDFTDLQDET AIAARNQIV EKEINKGISQ YNNLHRRJKT
301 RPDEMTFSLY D

25

SEC N° ID 79

Secuencia de nucleotidos de la region de codificacion de DNA

del gen MsbB de *Haemophilus influenzae* (no tipificable)

1 ATGTGGGA^A A^CAACAAA TTTACGTTTG ACGGCGAGAG TGGGCTATGA
51 AGCGCACTTT TCATGGTCGT ATTTAAAGCC TCAATATTGG GGGATTGGC
101 TTGGTATTTT CTTTTATTG TTGTTAGCAT TTGTGCTTT TCGTCTGGC
151 GATAAATTGA CCGGAAAATT AGGTATTGGG ATTAACATA AAGCAACAA
201 ACAOGGTACG CGTGACAAA CTAAC TTGCA ATA^N^TTTC CCTCATTOCA
251 CTGAACAACA ACGTGAGCAA GTGATTGATA AAATGTTTGC GGTGTGCGT
301 CAGGTTATGT TTGGTATTGG TGAGATTGCC ATCCGTTCAA AGAAACATTT
351 GCAGAAACGC AGCGAATTTA TCGGTCTTGA ACATATCGAA CAGGCAAAAG
401 CTGAAGGAAA GAATATTATT CTTATGGTGC CACATGGCTG GCGGATTGAT
451 GCGTCTGGCA TTATTTTGCA CACTCAAGGC ATGCCAATGA CTTCTATGTA
501 TAAATCCACAC CGTAATCCAT TGGTGGATTG GCTTTGGAGS ATTACAGGCC
551 AACGTTTCGG CCGGAAAATG CATGCACGCC AAAATGGTAT TAAACCTTTT
601 TTAAGTCATG TTCGTAAAGG CGAAATGGGT TATTACTTAC CCGATGMAA
651 TTTTGGGGCG GAACAAGCGG TATTGTTGA TTTCTTTGGG ACTTATMAAG
701 CGACAT^ACC AGCGTTAAAT AAAATGGCAA AACTTTCTAA AGCCGTTGTT
751 ATTCCAAATGT TTCCTCGTTA TAAAGCTGAA ACGGGCAAAAT ATGAATGGA
801 AATTCAATCCT GCAATGAATT TAAGTGATGA TCCTGAACAA TCAGCCGGAG
85 CAATGAAOEA AGAATAGAA TCTTTTGTGA CGCCAGCACC AGAGCAATAT
901 GTTTGGATTT TGCAATTATT GCGTACAGG AAAGATGGCG AAGATCTTTA
951 TGATTAA

5

10

15

Secuencia de proteínas identidad al 45% y similaridad al 56%
con MsbB de *E coli*

1 MSQDQNLRL TARVGYEAF SMSYLKPYM GIMLGIPFL LLAFFVPERLR
51 SKLTGRLGIM IGHEAKKQRT RAQTNLOYCP PHMTEQOREQ VIDRNFVVA
101 QVMPGIGEIA IRSKKHLQKR SEFIGLEHIE QAKAEGKII LMVPHGWAID
151 ASGIILHTOG MPMTSMYNPH RNPLVDWLMT ITRQRFQGRH HARONGIKPP

20

201 LSHVRGEMG YYLPDEDFCA EQSVFVDTFG TYKATLPGLN KMAKLSKAVV
251 IPNPPRYNAE TGRYENEIHP ANHLSDOPEQ SARANNEEIE SFVTPAPEQY
301 VWILOLLRTR KDGEDLYD

25

SEC N° ID 80

Secuencia de nucleotidos de la region de codificacion de DNA
del gen MsbB de *Moraxella catarrhalis*

```
1 ATGAGTTGCC ATCATCAGCA TAAGCAGACA CCCAAACAGC CCATATCCAT
51 TAAGCATATG CCAAGCTTGA CAGATACTCA TAACCAAGT AGCCAAAGTG
101 AGCCAAATC GTTTGAATGG GCGTTTITAC ATCCCAATA TTGGGGAGTT
151 TGCTGGCTT TTGGGTTGAT TTACCGCTG ATTTTCTAC CGCTGGGTG
201 GCAGTTTGG ATCGGCAAGC GTCTGGCAT TTGGTACAT TACTTGGCTA
251 AAGCCGAGT TCAGAGCACT CTAAACAGCC TGACGCTTAC CTTCCTCAAT
301 CAAGCAAAAT CAAAGACAAA GCGCAGCGCA CGGCAAGTAT TTATTAATCA
351 AGGTATGGT ATTTTGAAT GTTATGTGC ATGGTTTCGC CCTAATGTCT
401 TTAAGCGCAC TTTAGCAAT TCTGCTTAC AGCATTGAT TGATGCCCAA
451 AAACAAATA AAGCGGTGAT TTACTTGGT GGACATCGCA CGACGCTTGA
501 TTTGGGCGGT CGGTTATGTA CACAGTTTIT TGCGGCGGAC TGCGGTATC
551 GCGCACAAA CAACTCTTGT CTGAATGGT TATCTATAA TGACGCGCGC
601 TGTATCTTTG ATGAGCAAA CTCAATCGT GATATGAAA AACTCATCAC
651 TCGGCTCAA CAAGGTGCGA TAATTGCTA TTCACCTGAT CAAGATTGTG
701 GTCTTGAGCA TGGCGTGA GCGACCTTT TTGGTGTGCC TGACGCAAGC
751 ATTAACGCTC AGCGTCTCT TATTAACTG GGTATAAAG CCAATCTCTC
801 GTGATCATC ATGATGGATA TGCTCAGCA AACGCGCAT TATATCGCAA
851 AAGGTACCG TCCACATTAT CACATCAGC TAAGCGCTGT GTTAAAAAAT
901 TATCCAGCG ATGAGAAAC CGCGATGCT GAAGCATCA ATCGACTGAT
951 TAGGCAAAAT ATCAAAAAG ATTTAACCCA GTGGATGTGG TTTCATCGCC
1001 GCTTAAAC TCAAGCGAT GACACCAAT ACTATCAACA TTAATG
```

5

10

Secuencia de proteínas identidad al 28% y similaridad al 37%
con MsbB de E coli

```
1 MSCHHQKQT PKMAISIKHM PSLTDTHKQS SQAEPKSFEM AFLHPKYNQV
51 WLAFAILFL IFLPLWQFM IGKRLGILVH YLAERSVOOT LTNLQLTFPM
101 QPFSKULATA NOVFINOGIG IFESLCAMFR PWYKRTFSJ SGLQHLIDAQ
151 KOKKAVILIG GHRTTLDLGG RLCTOFFAAD CVYRQWML LAMFLYNARR
201 CIFDEQISNR DNKRLITRLK QGRJINYSPO QDFGLEBGVM ATFFGVPAAT
251 ITAQRLLIKL GSKAMPPVII MMDMLRQTPD YIAKRNHPHY NISLSAVLKM
301 YPSOOSTAOA ERINRLIDQM IQKDLTQNMW FRRKRTQAD DTNYTQH
```

20

SEC N° ID 81
Secuencia de nucleotidos de la region de codificacion de DNA
del gen MsbB de Neisseria (meningococo B)

1 ATGAAATTTA TATTTTTTGT ACTGTATGTT TTGCAGTTTC TGCCGTTTGC
51 GCTGCTGCAC AAACCTTGCCG ACCTGAOGGG TTTGCTCGGC TACCTTTTGG
101 TCAAAACCCCG CGCCCGTATC GCGGAAATCA ATTTGGCAAA ATGCTTTTCC
151 GAGTGGGACG GAAAAAACCG CGAAACCGTA TTGAAGCAGC ATTTCAAACA
201 TATGGCGAAA CTGATGCTTG AATACGGCTT ATATTGGTAC GCGCTGCGG
251 GCGGTTTGAA ATCGCTGGTG CGTTACCGCA ATAGGCATTA TTTGACGAC
301 GCGTGGCGG CGGGGGAAAA AGTCATCAFF CTGTACCCGC ACTTCACCGC
351 GTTCGAGATG CGCGGTGACG CGCTTAATCA GGATGTADCG CTGATCAGTA
401 TGTATTCCCA CCAAAAAAAC AAGATATTGG ACGCAGAGAT TTTGAAAGGC
451 CGCAACCGCT ACGACATGTT CTTCCTTATC GCGCGCACCG AAGCGGTGCG
501 CGCCCTCGTC AARCACTTCC GCAAAAGCAG CGCGCGCTTT CTGTATCTGC
551 CGATCAGGA TTTCCGACCG AACGATTCGG TTTTGTGGA TTTTTCGGT
601 ATTCAGACGG CAACGATTAC CGGCTTGAGC CGCATTCGCG CGCTTGCAAA
651 TGCAAAAGTG ATACCCGCCA TCCCGGTCCG CGAGGCGGA AATACGGTTA
701 CATTCGATTT CTACCCGGCT TGGGAATCCT TTCCGAGTGA AGATGCGCAG
751 GCGGACCGCG AGCGCATGAA CCGTTTTATC GAGGAACCGT GCGCGAACAT
801 CCGGAGCAGT ATTTTGGCT GCACAGCGT TTCAAAACCC GTCCGGAAGC
851 CAGCCCGAT TTTTACTCAT ACGTAA

5

10

15

Secuencia de proteínas identidad al 25% y similaridad al 36%
con MsbB de *E coli*

1 MKYFFVLYV LQFLPFALLH RLADLTGLLA YLLVNPRAVI GEINLAKCFP
51 EWQG KRETV LKQHPKHNAR LMLEYGLYNY APAGALKS V RYRNKHYLDO
101 ALAAGEKVII LYPHETATEN AVYALNQDVP LISMYSHQKN KILDAQILKG
151 RHRIDNVFLI GRTEGVRAIV RQFRKSSAPF LYLPODQFCR NDSVVFVDFTC
201 IQTATITGLS RIAALANAK IPAIPVREAD NTVTLMFYPA WESFSPEDAQ
251 ADAQROHREFI EERCANIPSS IFGCTSVSKP VRKAAPIFTD T

20

182

Habiendose descrito la invencion como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1 Una preparación de ^{vesículas} ampollas genéticamente modificada a partir de una cepa bacteriana Gram negativa, caracterizada porque dicha preparación es obtenible empleando uno o mas procedimientos seleccionados del siguiente grupo

10 a) Un procedimiento de reduccion de antígenos variables inmunodominantes o no protectores en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de determinacion de la identidad de dicho antígeno, modificación de una cepa bacteriana para producir

15 menos o nada del citado antígeno y preparacion de ampollas de la citada cepa,

b) un procedimiento de sobrerregulacion de la expresión de antígenos de OMP protectores en la preparacion de ampollas, que comprende las etapas de indentificacion de dicho antígeno, modificacion de una cepa bacteriana para introducir una secuencia promotora más fuerte cadena arriba de un gen que codifica dicho antígeno, de manera que el citado gen se exprese a un nivel superior al de la ampolla no modificada, y

20 preparación de ampollas de la citada cepa,

25

c) un procedimiento de sobrerregulación de la expresion de antígenos de OMP protectores condicionalmente expresados en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de identificacion de dicho

antígeno, modificación de una cepa bacteriana para eliminar los mecanismos de control represivo de su expresión y preparación de ampollas de la citada cepa,

5 d) un procedimiento de modificación de la parte lipido A del LPS bacteriano en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de identificación de un gen implicado en la transformación ^(en) tóxica de la parte lipido A de LPS, modificación de una cepa bacteriana para reducir o eliminar la expresión del citado gen, y preparación de ampollas de la citada cepa,

10 e) un procedimiento de modificación de la parte lipido A del LPS bacteriano en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de identificación de un gen implicado en la transformación en menos tóxica de la parte lipido A de LPS, modificación de una cepa bacteriana para introducir una secuencia promotora más fuerte cadena arriba del citado gen, de modo que el citado gen se exprese a un nivel superior que en la ampolla no modificada, y preparación de ampollas de la citada cepa,

15 f) un procedimiento de reducción de la toxicidad del lipido A en la preparación de ampollas y aumento de los niveles de antígenos protectores, que comprende las etapas de modificación del cromosoma de una cepa bacteriana para incorporar un gen que codifica un péptido polimixina A, o un derivado o análogo de este, condensado con un antígeno protector, y preparación de ampollas de la citada cepa, o

g) un procedimiento de creacion de antigenos de OMP conservados en la preparaci3n de ampollas, que comprende las etapas de identificaci3n de dicho antígeno, modificacion de una cepa bacteriana para suprimir las regiones variables de un gen que codifica dicho antígeno, y preparacion de ampollas de la citada cepa

2 La preparacion de ampollas genéticamente modificadas de la reivindicaci3n 1, en la que dicha preparacion es obtenible empleando uno o mäs de los procedimientos seleccionados del siguiente grupo

h) un procedimiento de reducci3n de la expresion, en la preparacion de ampollas, de un antígeno que comparte similitud estructural con una estructura humana y puede ser capaz de inducir una respuesta inmune en humanos, que comprende las etapas de identificacion de un gen implicado en la biosíntesis del antígeno, modifiación de una cepa bacteriana para reducir o desactivar la expresion del citado gen, y preparaci3n de ampollas de la citada cepa, o

i) un procedimiento de sobrerregulaci3n de la expresion de antigenos de OMP protectores en la preparacion de ampollas, que comprende las etapas de identificacion del citado antígeno, modificacion de una cepa bacteriana para introducir en el cromosoma una o mäs copias de un gen que codifique el citado antígeno controlado por una secuencia promotora heterologa mas fuerte, y preparacion de ampollas de la citada cepa

3 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 1 o 2, en la que las etapas de modificación de los procedimientos a), b), c), d), e), h) e i) se llevan a cabo por sucesos de recombina-
5 ción homologa entre una secuencia de al menos 30 nucleótidos del cromosoma bacteriano y una secuencia de al menos 30 nucleótidos de un vector transformado en la cepa

4 La preparación de ampollas de la reivindicacion 3, en la
10 que las etapas de modificación se llevan a cabo por sucesos de recombina-
ción homóloga por doble cruzamiento entre dos secuencias de al menos 30 nucleótidos del cromosoma bacteriano, separadas por una secuencia de nucleotidos "X", y dos secuencias de al menos 30 nucleótidos de un vector transformado
15 en la cepa, separadas por una secuencia de nucleótidos "Y", en la que durante el suceso de recombina-
ción, X e Y se intercambian

5 La preparacion de ampollas de la reivindicacion 4, en la
20 que las dos secuencias de nucleotidos tienen aproximadamente la misma longitud y en la que el vector es una molécula de DNA lineal

6 La preparacion de ampollas de las reivindicaciones 4 o 5,
25 en la que los sucesos de recombina-
ción de los procedimientos a), b), c), d), e) y h) se llevan a cabo en la region del cromosoma 1000 pb cadena arriba del codon de iniciación del gen de interés

7 La preparacion de ampollas de la reivindicacion 6, en la que para los procedimientos a), d) o h) la secuencia de nucleótidos X comprende parte de la región promotora del gen, y la secuencia de nucleótidos Y comprende una region promotora débil o ninguna region promotora

8 La preparación de la reivindicacion 6, en la que para los procedimientos b) o e), la secuencia de nucleotidos Y comprende una región promotora fuerte para la bacteria

9 La preparacion de ampollas de la reivindicacion 8, en la que la secuencia de nucleotidos Y esta insertada 200-600 pb cadena arriba del codon de iniciacion del gen de interes

10 La preparación de ampollas de la reivindicación 9, en la que la secuencia de nucleotidos Y está insertada aproximadamente 400 pb cadena arriba del codon de iniciación del gen de interes

11 La preparacion de ampollas de la reivindicacion 6, en la que para el procedimiento c), la secuencia de nucleotidos X comprende parte de la secuencia de control represivo del promotor, y la secuencia de nucleótidos Y no comprende dicha secuencia

12 La preparacion de ampollas de las reivindicaciones 4 o 5, en la que los sucesos de recombinación de los procedimientos a), d) y h) se llevan a cabo de modo que la secuencia de nucleotidos X comprende parte de la secuencia de codificacion

del gen de interes

13 La preparacion de ampollas de las reivindicaciones 4 o 5,
en la que los sucesos de recombinación del procedimiento 1) se
5 llevan a cabo de modo que la secuencia de nucleotidos Y
comprende otra copia del gen en un modulo de expresion

14 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 1-13
aislada de una cepa B de *Neisseria meningitidis* modificada

10

15 Ls preparacion de ampollas de la reivindicacion 14,
obtenible empleando al menos los procedimientos b) y/o 1), en
la que uno o mas genes de una lista que comprende NspA,
similar a Hsf, Hap, PorA, PorB, OMP85, PilQ, PldA, FrpB, TbpA,
15 TbpB, FrpA, FrpC, LbpA, LbpB, FhaB, HasR, lipo02, Tbp2
(lipo28), MltA (lipo30) y ctrA están sobrerregulados

16 La preparacion de ampollas las reivindicaciones 14 o 15,
obtenible empleando al menos el procedimiento a), en la que uno
20 o más genes de una lista que comprende PorA, PorB, PilC, TbpA,
TbpB, LbpA, LbpB, Opa y Opc estan subrregulados

17 La preparacion de ampollas de las reivindicaciones 14-16,
obtenible empleando al menos el procedimiento d), en la que uno
25 o más genes de una lista que comprende htrB, msbB y lpxK estan
subrregulados

18 La preparacion de ampollas de las reivindicaciones 14-17,
obtenible empleando al menos el procedimiento e), en la que uno

o más genes de una lista que comprende pmrA, pmrB, pmrE y pmrF
están sobrerregulados

19 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 14-18,
5 obtenible empleando al menos el procedimiento c), en la que la
secuencia de control represivo del promotor es la región
operadora y/o los genes TbpB, LbpB o ambos

20 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 14-19,
10 obtenible empleando al menos el procedimiento h), en la que uno
o más genes de una lista que comprende galE, siaA, siaB,
siaC, siaD, ctrA, ctrB, ctrC y ctrD están subregulados

21 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 1-13
15 aislada a partir de una cepa de *Moraxella catarrhalis*
modificada

22 La preparación de ampollas de la reivindicación 21,
20 obtenible empleando al menos el procedimiento b) y/o i), en la
que uno o más genes de una lista que comprende OMP106, HasR,
PilQ, OMP85, lipo06, lipo10, lipo11, lipo18, P6, ompCD, CopB,
D15, Omp1A1, Hly3, LbpA, LbpB, TbpA, TbpB, OmpE, UspA1, UspA2 y
Omp21 están sobrerregulados

25

23 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 o
22, obtenible empleando al menos el procedimiento a), en la que
uno o más genes de una lista que comprende CopB, OMP106,
OmpB1, TbpA, TbpB, LbpA y LbpB están subregulados

24 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21-23, obtenible empleando al menos el procedimiento d), en la que uno o más genes de una lista que comprende htrB, msbB y lpxK están subregulados

25 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21-24, obtenible empleando al menos el procedimiento e), en la que uno o más genes de una lista que comprende pmrA, pmrB, pmrE y pmrF están sobrerregulados

26. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 1-13 aislada a partir de una cepa de *Haemophilus influenzae* modificada

27 La preparación de ampollas de la reivindicación 26, obtenible empleando al menos el procedimiento b) y/o 1), en la que uno o más genes de una lista que comprende D15, P6, TbpA, TbpB, P2, P5, OMP26, HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, H1a, Hsf, Hap, H1n47 e H1f están sobrerregulados

28 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 26 o 27, obtenible empleando al menos el procedimiento a), en la que uno o más genes de una lista que comprende P2, P5, H1f, proteasa IgA1, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, TbpA y TbpB están subregulados

29 La preparación de ampollas de las reivindicaciones 26-28, obtenible empleando al menos el procedimiento d), en la que uno

o mas genes de una lista que comprende htrB, msbB y lpxK estan subrregulados

30 La preparacion de ampollas de las reivindicaciones 26-29,
5 obtenible empleando al menos el procedimiento e), en la que uno o más genes de una lista que comprende pmrA, pmrB, pmrE y pmrF estan sobrerregulados

31 Una preparación de ampollas modificadas genéticamente[?] de
10 una cepa bacteriana Gram negativa, caracterizada porque la citada preparacion es obtenible empleando un procedimiento que comprende las etapas de introducción de un gen heterologo, opcionalmente controlado por una secuencia promotora fuerte, en un cromosoma por recombinacion homologa, y la preparacion de
15 ampollas de la citada cepa

32 La preparacion de ampollas de la reivindicacion 31, en la que la cepa Gram negativa es *Neisseria gonorrhoeae*, y el gen heterólogo es un OMP protector de *C trachomatis*

20 33 La preparación de ampollas de la reivindicacion 31, en la que la cepa Gram negativa es *Haemophilus influenzae*, y el gen heterólogo es un OMP protector de *Moraxella catarrhalis*

25 34 La preparacion de ampollas de la reivindicación 31, en la que la cepa Gram negativa es *Moraxella catarrhalis*, y el gen heterólogo es un OMP protector de *Haemophilus influenzae*

35 Una vacuna que comprende la preparacon de ampollas de las

reivindicaciones 1-34 y un excipiente farmacéuticamente aceptable

36 Una vacuna meningocócica que comprende la preparación de
5 ampollas de las reivindicaciones 14-20 y uno o más polisacáridos capsulares meningocócicos solos o conjugados seleccionados de los serotipos A, C, Y o W

37 Una vacuna contra la meningitis que comprende la
10 preparación de las reivindicaciones 14-20 o la preparación de ampolla de la reivindicación 32, un polisacárido capsular de *H influenzae* b conjugado y uno o más polisacáridos capsulares neumocócicos solos o conjugados

15 38 Una vacuna contra la otitis media que comprende la preparación de ampollas de las reivindicaciones 21-25, uno o mas polisacáridos capsulares neumocócicos solos o conjugados y uno o más antígenos que puedan proteger a un huésped frente a la infección por *H influenzae* no tipificable

20 39 Una vacuna contra la otitis media que comprende la preparación de ampollas de las reivindicaciones 26-30, uno o más polisacáridos capsulares neumocócicos solos o conjugados y uno o mas antígenos que puedan proteger a un huésped frente a
25 la infección por *Moraxella catarrhalis*

40 La vacuna contra la otitis media de las reivindicaciones 38 o 39, comprendiendo la vacuna además uno o mas antígenos de proteína que pueden proteger a un huésped frente a

Streptococcus pneumoniae y/o uno o mas antígenos que pueden proteger a un huesped frente a RSV y/o uno o mas antígenos que pueden proteger a un huesped frente al virus de la gripe

5 41 Un vector adecuado para realizar los sucesos de }
recombinacion descritos en las reivindicaciones 3-34

10 42 Una cepa bacteriana Gram negativa modificada de la que se
prepara la preparacion de ampollas de las reivindicaciones 1-
34

43 Una vacuna de ampollas, fantasma o de celulas enteras
muertas Gram negativa no toxica adecuada para uso pediátrico

15 44 Una secuencia polinucleotida aislada que se hibrida en
condiciones muy estrictas con al menos una parte de 30
nucleótidos de los nucleotidos de la SEC N° ID 2-23, 25, 27-81
o de una cadena complementaria de estas

20 45 La secuencia polinucleotida aislada de la reivindicacion }
44, que comprende al menos 30 nucleótidos

25 46 La secuencia polinucleotida aislada de la reivindicacion
45, que comprende al menos 30 nucleotidos de la SEC N° ID 2-
23, 25, 27-81 o de una cadena complementaria de estas

47 El uso de una secuencia polinucleotida aislada de las
reivindicaciones 44-46 para realizar un suceso de recombinación
homóloga en los 1000 pb cadena arriba de un gen cromosómico

bacteriano Gram negativo para aumentar o reducir la expresion del citado gen

48 Un procedimiento para sobrerregular genéticamente la expresion de un gen en una cepa bacteriana Gram negativa que comprende las etapas de preparacion de un vector que comprende una secuencia promotora fuerte y una secuencia de nucleotidos de al menos 30 nucleótidos, que es capaz de recombinacion con una secuencia de al menos 30 nucleótidos en los 1000 pb cadena arriba del gen, la transformacion de una cepa bacteriana con el vector, y la realizacion de un suceso de recombinacion homologa entre el cromosoma y el vector para introducir el promotor dentro de las 1000 pb cadena arriba del codón de iniciacion del gen

Recombinacion homologa

49 El procedimiento de la reivindicación 48, en el que el promotor se introduce dentro de los 200-600 pb cadena arriba del codon de iniciacion del gen

50 El procedimiento de la reivindicación 49, en el que el promotor se introduce dentro de los 400 pb cadena arriba del codon de iniciación del gen

51 El procedimiento de las reivindicaciones 48-50, en el que el suceso de recombinacion homologa se efectua a traves de un doble cruzamiento entre dos secuencias de al menos 30 nucleótidos en el cromosoma bacteriano, separadas por la secuencia de nucleotidos "X", y dos secuencias de al menos 30 nucleótidos en el vector, separadas por la secuencia de

nucleótidos "Y" que comprende la secuencia promotora fuerte, en el que el vector es una secuencia de nucleótidos lineal y en el que durante el suceso de recombinación X e Y se intercambian

5 52 El procedimiento de la reivindicación 51, en el que las dos secuencias de nucleótidos son de aproximadamente la misma longitud

10 53 Una cepa bacteriana modificada obtenible por los procedimientos de las reivindicaciones 48-52

15 54 Un procedimiento para producir una preparación de ampolla modificada genéticamente a partir de una cepa de bacterias Gram negativas mediante el empleo de uno o mas procedimientos seleccionados a partir de los siguientes grupos

a) un procedimiento de reducción de variable inmunodominante o antígenos no protectores en la preparación de ampolla que comprende las etapas de determinar la identidad del mencionado antígeno, modificación de una cepa bacteriana para producir menor o ninguna cantidad del mencionado antígeno y preparación de ampollas de la mencionada cepa,

25 b) un procedimiento de sobrerregulación de la expresión de antígenos de OMP protectores en la preparación de ampolla que comprende las etapas de identificación del mencionado antígeno, modificación de la cepa bacteriana así como la introducción en sentido contrario de una secuencia promotora más fuerte de un gen que codifica el mencionado antígeno tal que el mencionado gen se expresa a un nivel superior que la ampolla no modificada, y preparación de ampollas de la

significa
comparación

mencionada cepa,

c) un procedimiento de sobrerregulacion de la expresion de antígenos de OMP en la preparación de ampollas que comprende las etapas de, identificar el mencionado antígeno, modificación
5 de una cepa bacteriana así como la eliminacion de los mecanismos de control represivo de su expresión, y preparación de ampollas de la mencionada cepa, d) un procedimiento

de modificacion de la parte lipido A del LPS bacteriano en la preparacion de ampollas, que comprende las etapas de
10 identificacion de un gen implicado en la transformacion en tóxica de la parte lipido A de LPS, modificacion de una cepa bacteriana para reducir o eliminar la expresion del citado gen, y preparacion de ampollas de la citada cepa,

e) un procedimiento de modificacion de la parte lipido A
15 del LPS bacteriano en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de identificación de un gen implicado en la transformacion en menos tóxica de la parte lipido A de LPS, modificación de una cepa bacteriana para introducir una secuencia promotora mas fuerte cadena arriba del citado gen, de
20 modo que el citado gen se exprese a un nivel superior que en la ampolla no modificada, y preparación de ampollas de la citada cepa,

f) un procedimiento de reducción de la toxicidad del lipido A en la preparación de ampollas y aumento de los niveles
25 de antígenos protectores, que comprende las etapas de modificación del cromosoma de una cepa bacteriana para incorporar un gen que codifica un peptido polimixina A, o un derivado o analogo de este, condensado con un antígeno protector, y preparacion de ampollas de la citada cepa, o

g) un procedimiento de creación de antígenos de OMP conservados en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de identificación de dicho antígeno, modificación de una cepa bacteriana para suprimir las regiones variables de un gen que codifica dicho antígeno, y preparación de ampollas de la citada cepa

h) un procedimiento de reducción de la expresión dentro de la preparación de ampolla de un antígeno que comparte una similaridad estructural con una estructura humana y puede ser capaz de inducir una respuesta autoinmune en humanos, que comprende las etapas de identificación de un gen implicado en la biosíntesis del antígeno, modificación de una cepa bacteriana así como la reducción o eliminación de la expresión del mencionado gen, y obtención de ampollas de la mencionada cepa, o

i) un procedimiento de sobrerregulación de la expresión de antígenos de OMP protectores dentro de la preparación de ampolla que comprende las etapas de identificar el mencionado antígeno, modificar la cepa bacteriana así como la introducción dentro del cromosoma de una o más copias de un gen que codifica el mencionado antígeno controlado por una secuencia heteróloga, promotora más fuerte, y obtención de ampollas de la mencionada cepa

55. Un procedimiento de inmunización de un huésped humano contra una enfermedad causada por la infección de una o más de entre *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumonia*, tal

tratamiento

procedimiento comprende la administración al huesped de una dosis inmunoprotectora de la preparacion de ampolla de las reivindicaciones 1-34

- 5 (56) Utilizacion de la preparaci3n de ampolla de las reivindicaciones 1-34 en la preparacion de un medicamento para la inmunizacion de un huesped humano contra una enfermedad causada por la infecci3n de uno o mas de' entre Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenza, 10 Moraxella catarrhalis, Pseudomonas aeruginosa, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumonia

JP

COMPOSICIÓN DE VACUNA

RESUMEN

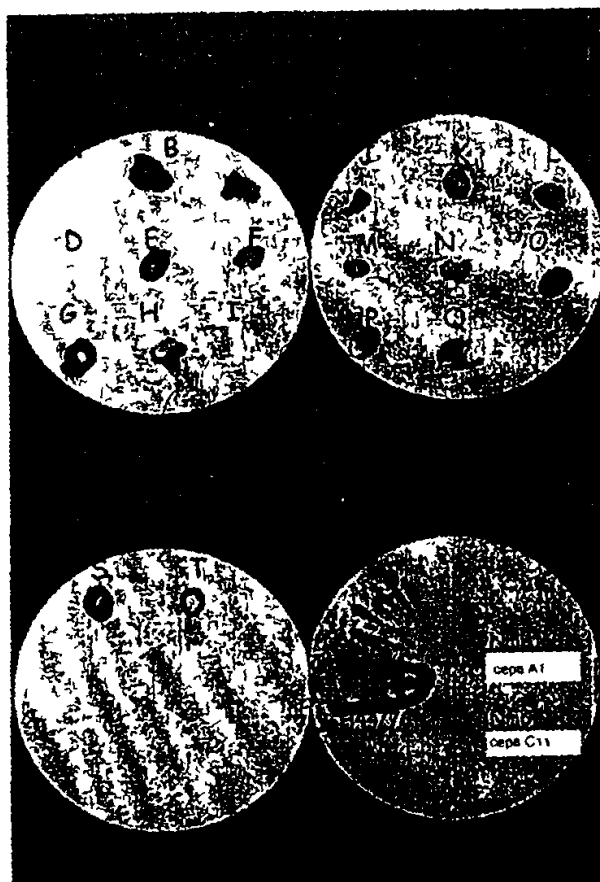
La presente invención se refiere a una vacuna de ampollas
5 Gram negativa inmunoprotectora y no tóxica adecuada para uso
pediátrico. Ejemplos de cepas Gram negativas de las que se
preparan las ampollas son *N meningitidis*, *M catarrhalis* y *H*
influenzae. Las ampollas de la invención se mejoran mediante uno
o más cambios genéticos en el cromosoma de la bacteria,
10 incluyendo la sobrerregulación de los antígenos protectores,
subregulación de los antígenos inmunodominantes no protectores
y detoxificación del resto Lipido A de LPS.

182

B45189

205

Figura 1



181

Figura 2

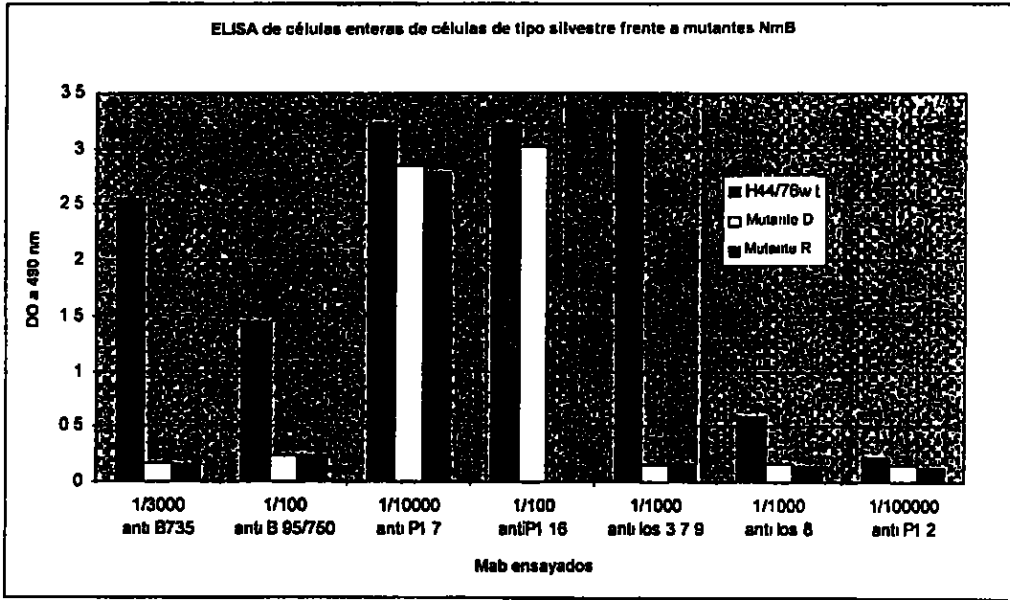
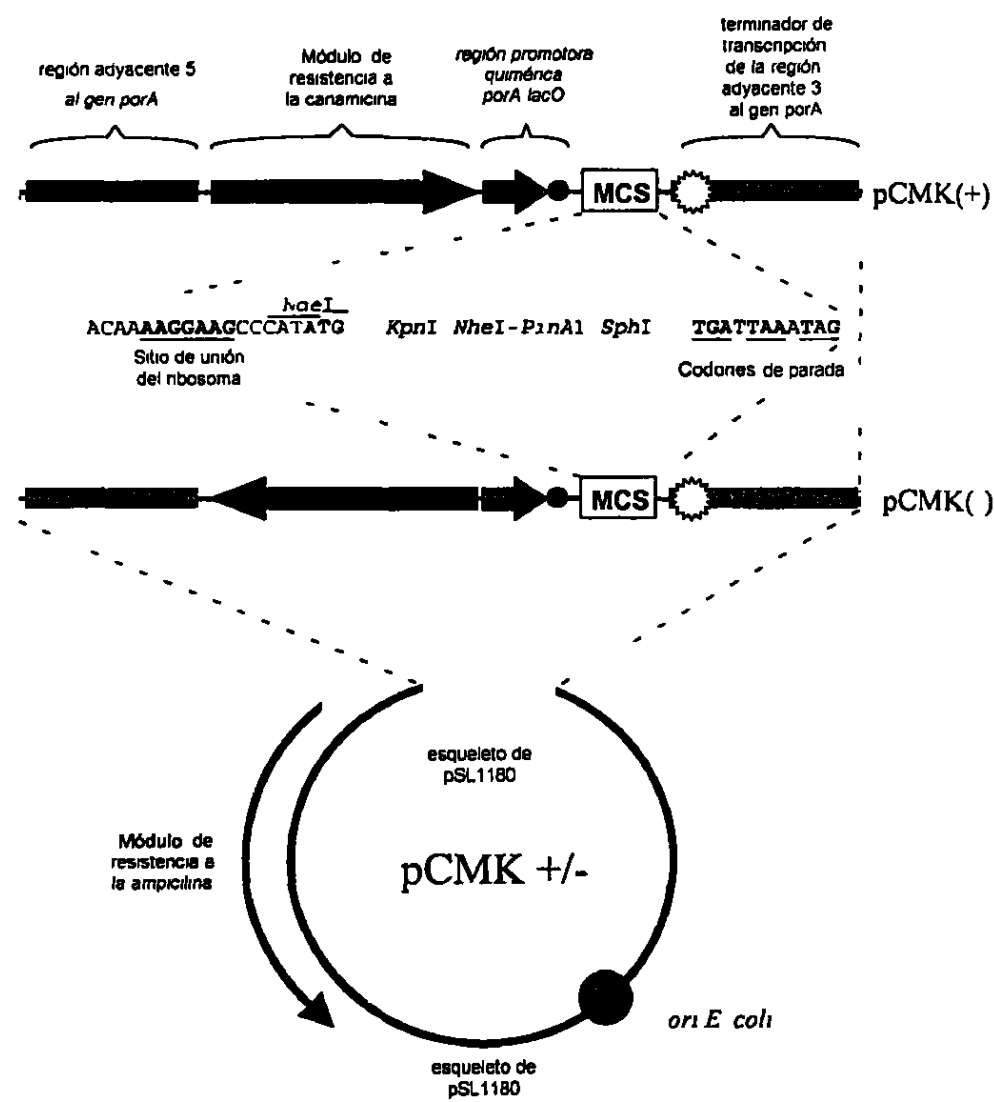


Figura 3



183

Figura 4

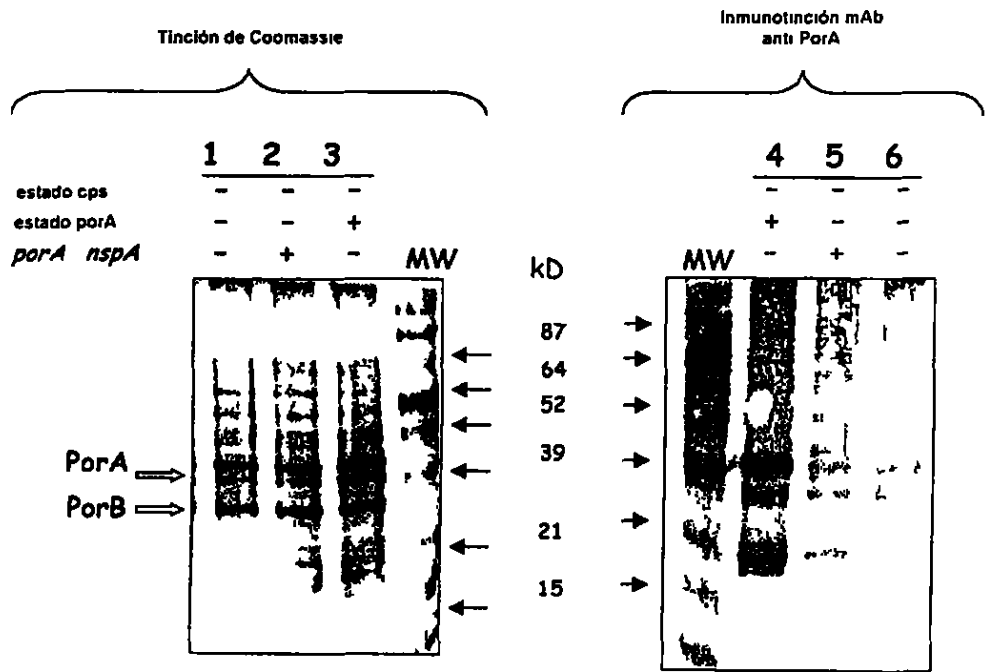
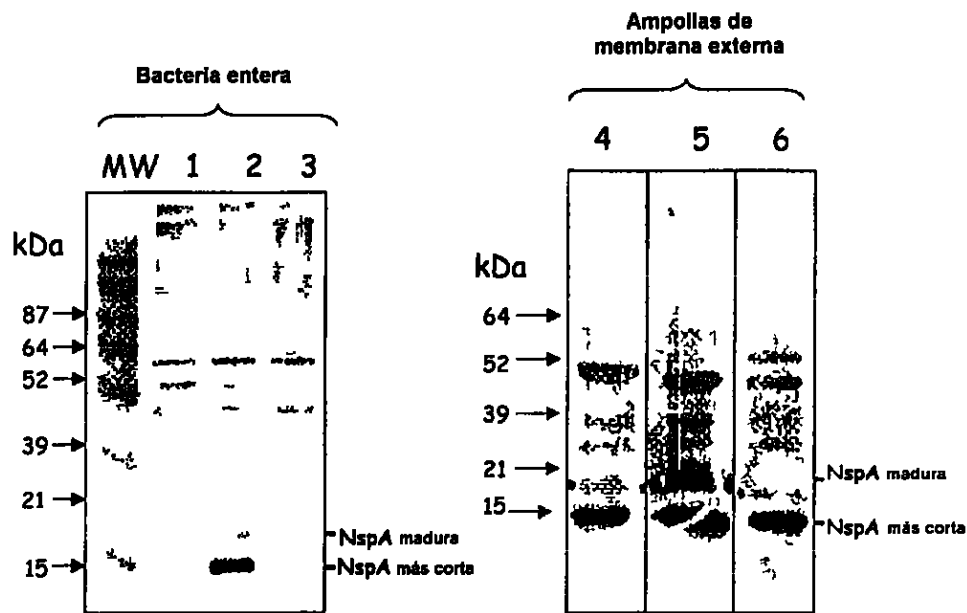


Figura 5



183

B45189

Figura 6

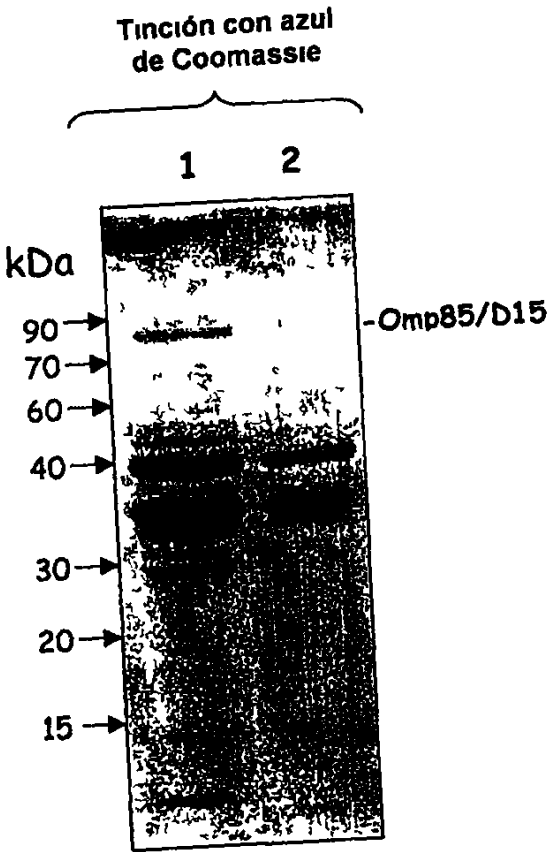
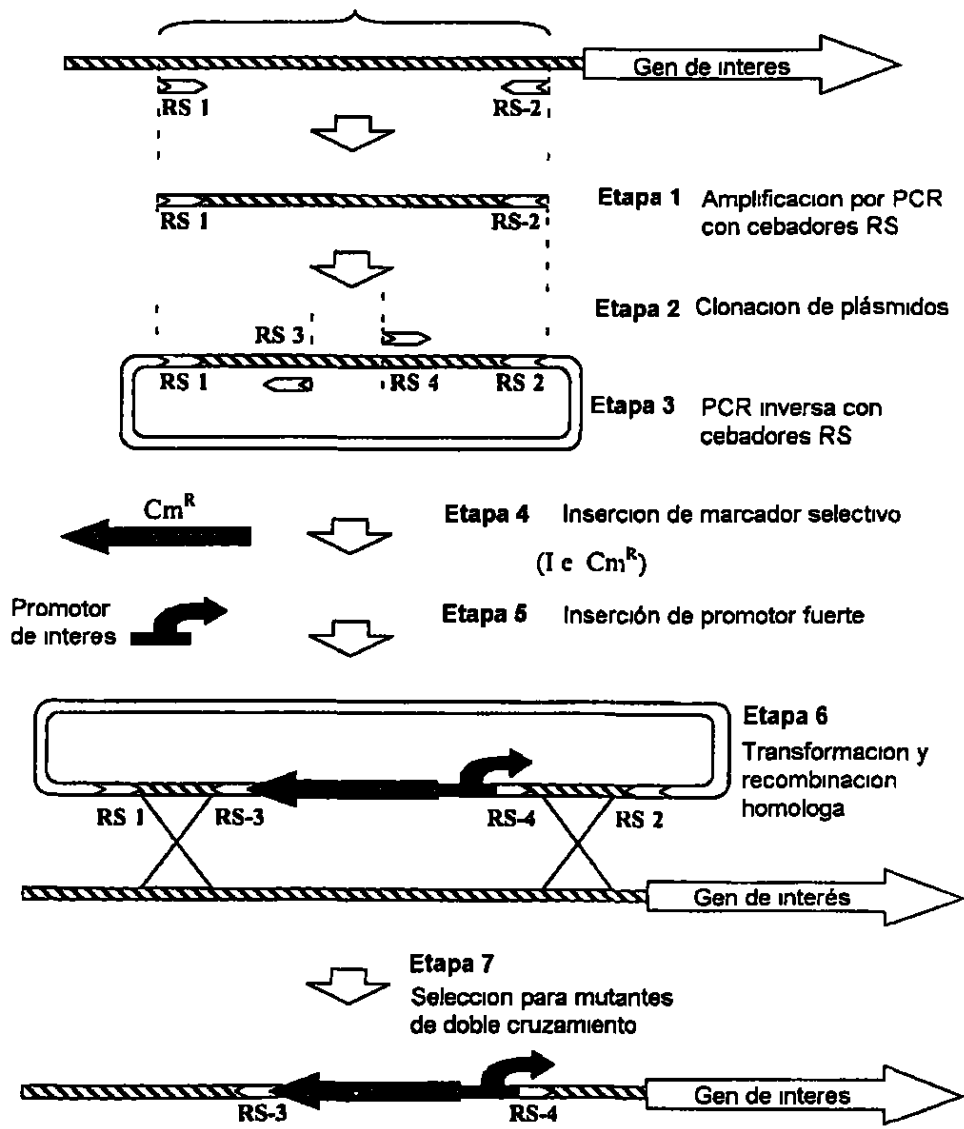
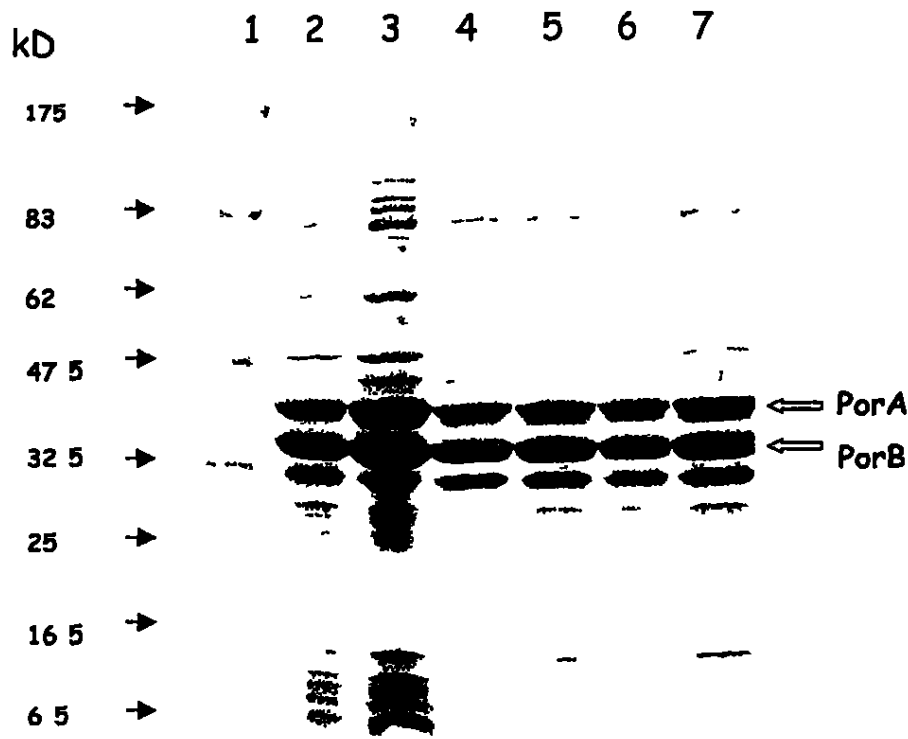


Figura 7



687

Figura 8



851

Figura 9

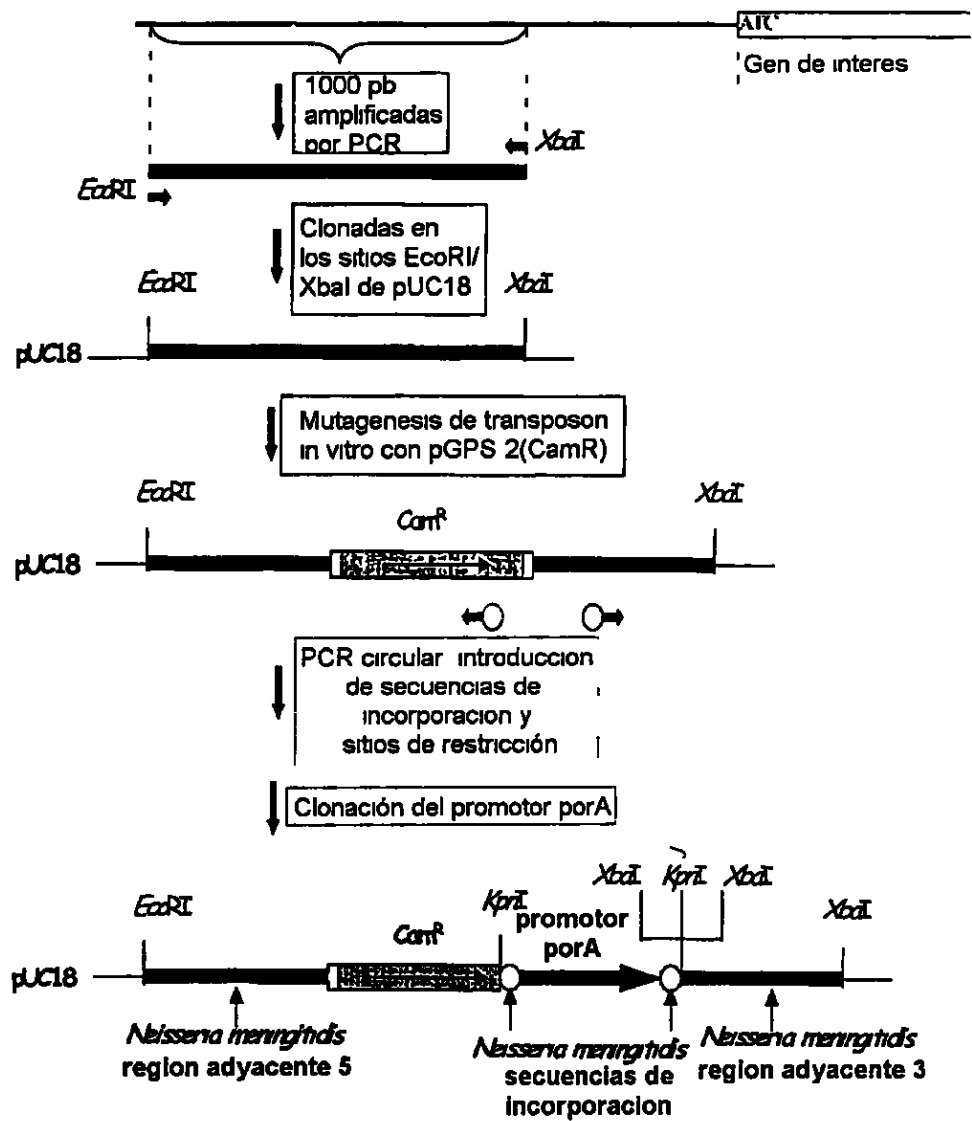


Figura 10

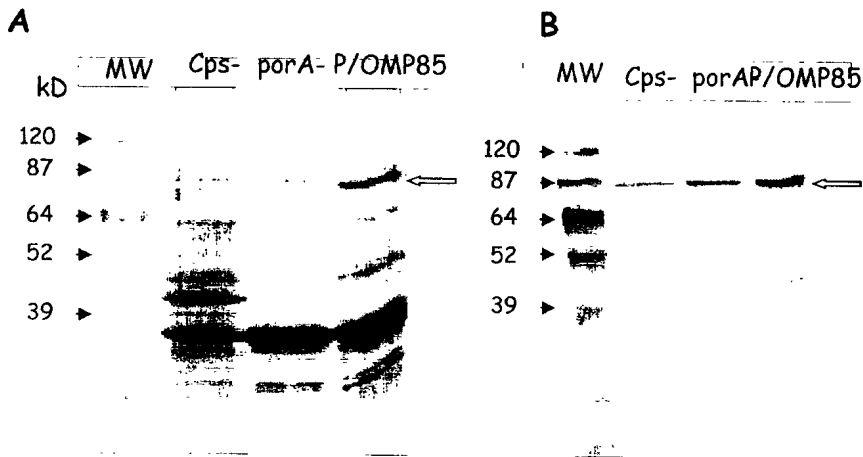
A



B



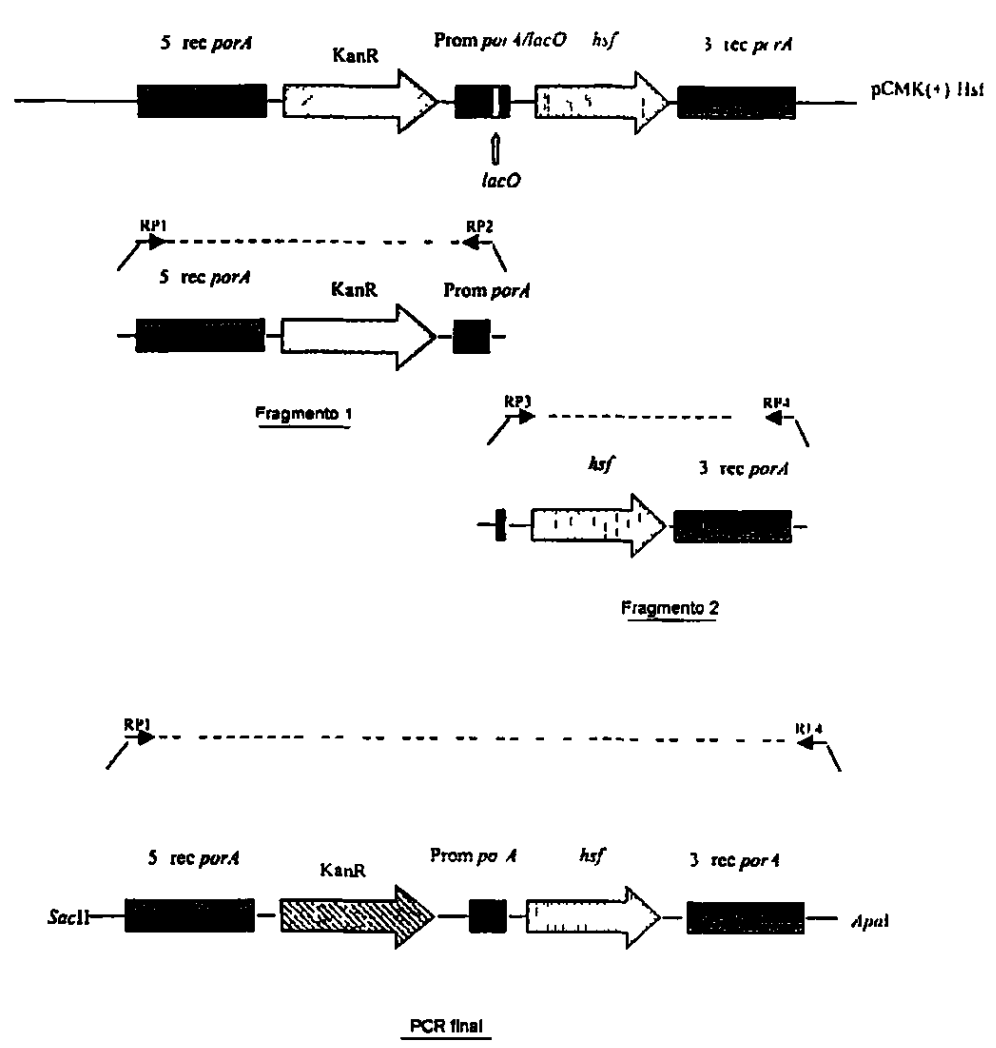
Figura 11



190

Figura 12

Representación esquemática de la estrategia PCR recombinante utilizada para suprimir el lacO en el promotor porA/lacO quimérico

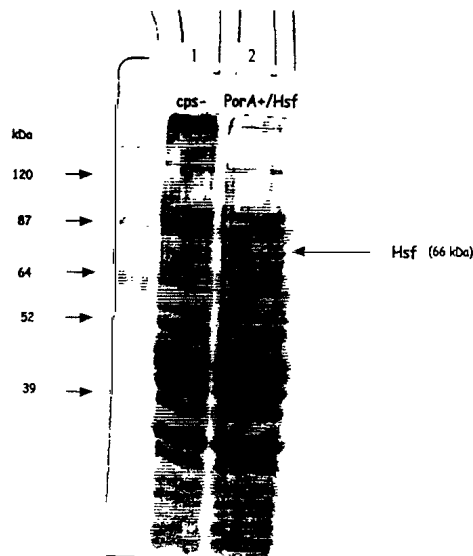


192

B45189

217

Figura 13



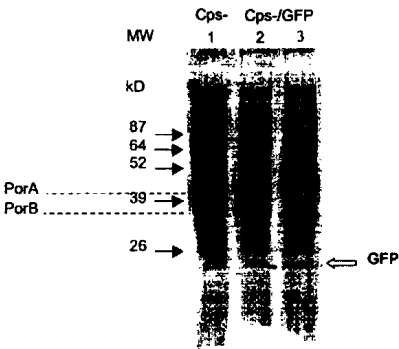
192

193

B45189

218

Figura 14



193

Figura 15

PAGE SDS 1

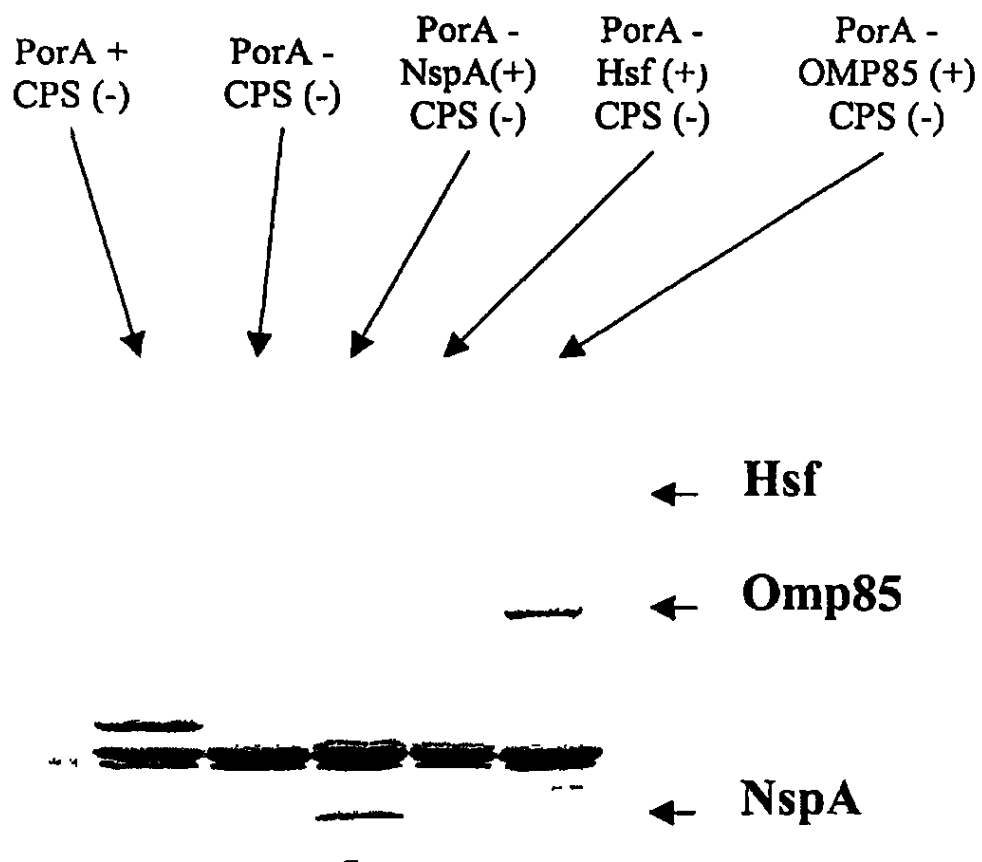


Figura 16

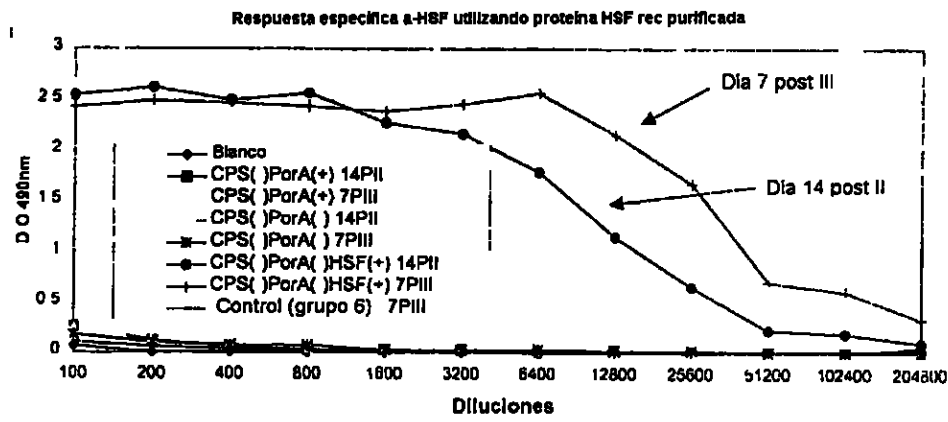
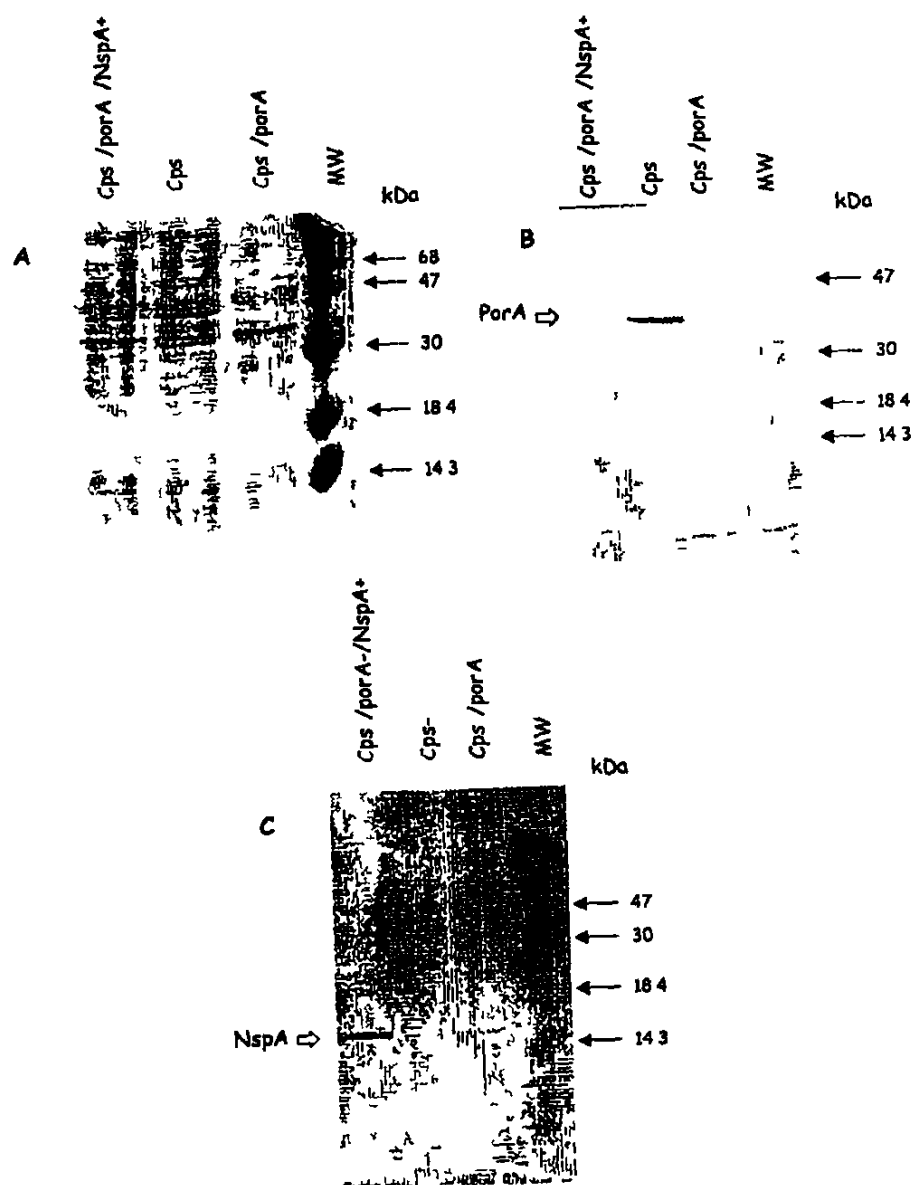


Figura 17



197
199

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No SOLICITUD

(51) INT CL

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN

(71) SOLICITANTE

(30) PRIORIDAD

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS s a

(31) No DE SOLICITUD GB 9918319 6

(72) INVENTORES

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN Agosto 3, 1999

Ver lista adjunta

(33) PAÍS Gran Bretaña

(74) APODERADO

GERMAN CASTILLO GRAU

(54) TÍTULO COMPOSICIONES DE VACUNA

(57) RESUMEN

1 Una preparación de ampollas genéticamente modificada a partir de una cepa bacteriana Gram negativa, caracterizada porque dicha preparación es obtenible empleando uno o más procedimientos seleccionados del siguiente grupo

- a) Un procedimiento de reducción de antígenos variables inmunodominantes o no protectores en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de determinación de la identidad de dicho antígeno, modificación de una cepa bacteriana para producir menos o nada del citado antígeno y preparación de ampollas de la citada cepa,
- b) un procedimiento de sobrerregulación de la expresión de antígenos de OMP protectores en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de indentificación de dicho antígeno modificación de una cepa bacteriana para introducir una secuencia promotora más fuerte cadena arriba de un gen que codifica dicho antígeno, de manera que el citado gen se exprese

(18) 3

a un nivel superior al de la ampolla no modificada, y preparación de ampollas de la citada cepa,

- c) un procedimiento de sobrerregulación de la expresión de antígenos de OMP protectores condicionalmente expresados en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de identificación de dicho antígeno modificación de una cepa bacteriana para eliminar los mecanismos de control represivo de su expresión y preparación de ampollas de la citada cepa,
- d) un procedimiento de modificación de la parte lípido A del LPS bacteriano en la preparación de ampollas que comprende las etapas de identificación de un gen implicado en la transformación en tóxica de la parte lípido A de LPS, modificación de una cepa bacteriana para reducir o eliminar la expresión del citado gen y preparación de ampollas de la citada cepa
- e) un procedimiento de modificación de la parte lípido A del LPS bacteriano en la preparación de ampollas, que comprende las etapas de identificación de un gen implicado en la transformación en menos tóxica de la parte lípido A de LPS, modificación de una cepa

bacteriana para introducir una secuencia promotora más fuerte cadena arriba del citado gen, de modo que el citado gen se exprese a un nivel superior que en la ampolla no modificada, y preparación de ampollas de la citada cepa

f) un procedimiento de reducción de la toxicidad del lípido A en la preparación de ampollas y aumento de los niveles de antígenos protectores que comprende las etapas de modificación del cromosoma de una cepa bacteriana para incorporar un gen que codifica un péptido polimixina A o un derivado o análogo de éste condensado con un antígeno protector, y preparación de ampollas de la citada cepa, o

g) un procedimiento de creación de antígenos de OMP conservados en la preparación de ampollas que comprende las etapas de identificación de dicho antígeno, modificación de una cepa bacteriana para suprimir las regiones variables de un gen que codifica dicho antígeno, y preparación de ampollas de la citada cepa

31 Una preparación de ampollas modificadas genéticamente de una cepa bacteriana Gram negativa, caracterizada porque la citada preparación es obtenible empleando un procedimiento que comprende las etapas de introducción de un gen heterólogo, opcionalmente controlado por una secuencia promotora fuerte, en un cromosoma por recombinación homóloga, y la preparación de ampollas de la citada cepa

48 Un procedimiento para sobrerregular genéticamente la expresión de un gen en una cepa bacteriana Gram negativa que comprende las etapas de preparación de un vector que comprende una secuencia promotora fuerte y una secuencia de nucleótidos de al menos 30 nucleótidos, que es capaz de recombinación con una secuencia de al menos 30 nucleótidos en los 1000 pb cadena arriba del gen, la transformación de una cepa bacteriana con el vector, y la realización de un suceso de recombinación homóloga entre el cromosoma y el

vector para introducir el promotor dentro de las 1000 pb cadena arriba del codón de iniciación del gen

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD []

- | | | |
|---|-----|-----|
| • Nombre e identificación del Solicitante | / | [] |
| • Nombre e identificación del Inventor | | [] |
| • Título o nombre de la Invención | (| [] |
| • Descripción | 5 | [] |
| • Reivindicaciones | 163 | [] |
| • Resumen | 179 | [] |
| • Comprobante de Pago | 2 | [] |

COMPLETA ~~[X]~~

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- **Nombre e identificación del peticionario** []
- **Nombre e identificación del inventor o diseñador** []
- **Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse** []
- **Representación gráfica** []
- **Comprobante de pago** []

COMPLETA [1]

INCOMPLETA []

Firma Responsabile

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: 00258242 00000000
 Fecha (AÑO) 2000-08-03 09 57 49 Folios 202
 Fech Transite 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
 Dependencia 2020 DIVISIC. DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador 334 12 21-2 3 4
Fax 281 31 25 e-mail info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D C Colombia

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-58242

Fecha 8 de Agosto del 2000

Se certifica que

Desde fecha 12 de julio de 1996,
del folio 86 459 al folio 86 464 del
libro de Protocolo N° 298, obra el poder
N° 16 769 conferido por SMITHKLINE
BEECHAMAN BIOLOGICALS S A

domiciliado(a) en Rixensart - Bélgica

al doctor GERMAN CASTILLO GRAU y/o ADRIANA
CASTILLO GIBSONE y/o LUIS FELIPE CASTILLO
GIBSONE

Representante en Santafé de Bogotá D C Los
mismos

Facultad para desistir SI

Revisado _____

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-58242

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344 art 14-a)

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art 14-c de la Decisión 344, literal g) del art 4 del Decreto 117/94)

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000)

SI ☒ NO ☐ EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París, Concepto 5 de enero de 1999 SIC)

SI ☐ NO ☒ CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS Deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad

En consecuencia, se conceptua que esta solicitud

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente

Santafé de Bogotá, D C , 8 de Agosto del 2000

EXAMINADOR JURIDICO
202022

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
PRIMER EXAMEN DE FORMA.

Radicación No 00-58242

Concepto Técnico No 1728

Clasificación Internacional de Patentes C12N 15/00, C12N 15/09, A61K 39/02

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art 8, Art 13-a)
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Art 13 a)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art 13-e)
- SI ☐ NO ☒ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art 13-b)
- SI ☐ NO ☒ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art 13-c)
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art 14-c junto con el literal d) del Art 4 del (Dto 117 del 94)
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art 14-c junto con el Dto 3464 del 26 de diciembre de 1980)
- SI ☐ NO ☒ Contiene una o mas reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art 13-d)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94
- SI ☒ NO ☐ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto 117 del 94
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P 104) en forma correcta (Art 14-c junto con el literal b) del Art 4 del Dto 117 del 94)
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art 14-c junto con el literal b) del Art 4 del Dto 117 del 94)
- SI ☐ NO ☒ **CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA.**

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA

- 1 El título de la invención es muy general, pues "composiciones de vacuna" no permite establecer sobre que tipo de compuestos versa la invención. Por tanto, se recomienda que se modifique el título de manera que corresponda con las reivindicaciones de la solicitud modificadas de acuerdo con las siguientes observaciones. Sírvase presentar nuevas tarjetas y extracto con el título modificado.
- 2 En general no es claro en toda la solicitud cual es el objeto de la invención. Lo anterior se afirma basándonos en el hecho de que el preámbulo de las reivindicaciones indica que el objeto de la invención es una preparación de ampollas, y el término ampollas no existe en el campo de la invención. dicho término deber ser reemplazado por ampolletas y aun mejor debe sustituirse por la mención de la forma farmacéutica inyectable que se desea proteger. Adicionalmente, la preparación no es la que se modifica genéticamente, la modificación genética solo ocurre en organismos vivos, en este caso son las cepas bacterianas Gram Negativas las que se modifican genéticamente. En consecuencia el objeto de la invención sería una forma farmacéutica inyectable que comprende una

200 205 202

cepa de bacterias Gram Negativas modificadas genéticamente mediante uno o más de los siguientes procedimiento Además de lo expuesto anteriormente, las reivindicaciones no son claras debido a que el objeto de la invención que es una composición farmacéutica no puede ser definido en función del procedimiento que se emplee en su elaboración Si el solicitante desea proteger la composición defina específicamente su fórmula o indique las características de la cepa modificada y el número de depósito mediante el cual se puede acceder a dichas cepas, de lo contrario la invención no se encuentra definida y por consiguiente no cumple con el artículo 13 de la Decisión 344 Si el solicitante considera que su invención son los procedimientos para modificar las cepas bacterias, indique que el objeto de la invención son los procedimientos y defínalos de acuerdo a los pasos que se indican en la reivindicación 1

- 3 Adicional a los defectos de claridad que se mencionaron en el punto anterior, se observa que ya sean el objeto de la invención las preparaciones farmacéuticas o los procedimientos para modificar las bacterias para mejorar sus cualidades como vacuna, dichas preparaciones o procedimientos carecen de unidad de invención puesto que cada uno de los procedimientos definidos en los literales a) al g) son completamente diferentes, lo único que tienen en común es que las bacterias que de su aplicación resulten van ser mejores como vacunas Ahora bien, si el objeto de la invención son las composiciones farmacéuticas que comprenden estas bacterias, dichas composiciones no cumplen con el requisito de unidad de invención ya que son completamente diferentes entre ellas, puesto que el compuesto activo que las caracteriza, es decir, las bacterias que resultan de los procedimientos antes mencionados son completamente distintas, por ejemplo, las bacterias resultantes del procedimiento a) van a tener una disminución en la cantidad de antígenos variables inmuno-dominantes o no protectores mientras las bacterias resultantes del procedimiento b) se caracterizan por sobre expresar antígenos OMP protectores, igual ocurre con las composiciones obtenidas mediante los restantes procedimientos

EXAMINADOR TÉCNICO 202016.

Bogotá, D C , 31 de octubre de 2000

202 206

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-58242

AUTO 2680

LA JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE

ARTICULO PRIMERO Reconocer personería al doctor GERMAN CASTILLO GRAU como apoderado de la Sociedad solicitante en los términos y para los efectos del poder conferido

ARTICULO SEGUNDO Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma

ARTICULO TERCERO Notificar por estado el presente auto advirtiéndolo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D C , a los 07 NOV 2000

LA JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D C, 07 NOV 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ____ NO ____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA