



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 496**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02700219 .5**

96 Fecha de presentación : **08.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1357938**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2003**

54 Título: **Cepas bacterianas formadoras de hipervesículas y su uso para la producción de vacunas.**

30 Prioridad: **08.02.2001 GB 0103171**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.10.2009

73 Titular/es: **Smithkline Beecham Biologicals S.A.**
rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es: **Berthet, Francois-Xavier Jacques;**
Denoel, Philippe;
Neyt, Cecile Anne;
Poolman, Jan y
Thonnard, Joelle

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

DESCRIPCIÓN

Cepas bacterianas formadoras de hipervesículas y su uso para la producción de vacunas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las composiciones de vacunas de bacterias Gram negativas, a su fabricación y al uso de dichas composiciones en medicina. Más en particular, se refiere al campo de nuevas cepas bacterianas Gram negativas diseñadas que tienen mejores propiedades de liberación de vesículas de la membrana externa, y a composiciones de vacunas que comprenden estas vesículas.

Antecedentes de la invención

Las bacterias Gram negativas están separadas del medio exterior por dos capas sucesivas de estructuras de membrana. Estas estructuras, denominadas la membrana citoplasmática y la membrana externa (OM), difieren tanto estructural como funcionalmente. La membrana externa tiene una función importante en la interacción de las bacterias patógenas con sus respectivos huéspedes. Por consiguiente, las moléculas bacterianas expuestas en la superficie representan objetivos importantes para la respuesta inmunitaria del huésped, haciendo que los componentes de la membrana externa sean candidatos atractivos para proporcionar vacunas, reactivos de diagnóstico y terapéuticos.

Las vacunas bacterianas de células enteras (muertas o atenuadas) tienen la ventaja de suministrar múltiples antígenos en su microentorno natural. Las desventajas de este procedimiento son los efectos secundarios inducidos por componentes bacterianos tales como endotoxinas y fragmentos de péptidoglucanos. Por otra parte, las vacunas de subunidades acelulares que contienen componentes purificados de la membrana externa pueden proporcionar una protección solo limitada y no pueden presentar los antígenos de forma adecuada al sistema inmunitario del huésped.

Proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos son los 3 constituyentes principales que se encuentran en la membrana externa de todas las bacterias Gram negativas. Estas moléculas están distribuidas de forma asimétrica: fosfolípidos de la membrana (principalmente en la parte interna), lipooligosacáridos (exclusivamente en la parte externa) y proteínas (lipoproteínas en la parte interna y externa, proteínas de membrana integrales o politópicas). Para muchos patógenos bacterianos que afectan a la salud humana, se ha mostrado que los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana externa son inmunógenas y factibles para conferir protección contra la correspondiente enfermedad mediante inmunización.

Sturgis y col. (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3:113) describen el contexto genómico y la distribución filogenética del grupo de genes tol-pal, y sugieren que tiene una función importante en el mantenimiento de la envuelta celular.

Bernadac y col. (1998, *Journal of Bacteriology* vol 180(18):4872) describen que cepas de *E. coli* con mutaciones en cada uno de los genes tol-pal, forman vesículas en la membrana externa.

La OM de las bacterias Gram negativas es dinámica, y dependiendo de las condiciones del entorno puede sufrir drásticas transformaciones morfológicas. Entre estas manifestaciones, se ha estudiado la formación de vesículas o “vesículas” en la membrana externa y se ha estudiado y documentado en muchas bacterias Gram negativas (Zhou, L y col. 1998, *FEMS Microbiol. Lett.* 163: 223-228). Entre estas, una lista no exhaustiva de patógenos bacterianos que se ha publicado que producen vesículas 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* and *Yersinia enterocolitica*. Aunque el mecanismo bioquímico responsable de la producción de las vesículas de la OM no se entiende completamente, estas vesículas de la membrana externa se han estudiado ampliamente ya que representan una metodología poderosa con el fin de aislar preparaciones de proteínas de la membrana externa en su conformación nativa. En este contexto, el uso de preparaciones de la membrana externa tiene un interés particular para desarrollar vacunas contra *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Chlamydia*. Además, las vesículas de la membrana externa combinan múltiples antígenos proteínicos y no proteínicos que es probable que confieren una protección extendida contra variantes entre especies.

Los ejemplos de especies bacterianas con las que se pueden hacer vacunas de vesículas son las siguientes:

60 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis (meningococos) es una bacteria Gram negativa aislada con frecuencia del tracto respiratorio superior humano. A veces produce enfermedades bacterianas invasivas tales como bacteremia y meningitis. La incidencia de la enfermedad meningocócica muestra diferencias estacionales y anuales geográficas (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; *Clin. Microbiol. Rev.* 2 (Supplement), S18-S24, 1989). La mayoría de las enfermedades en países templados se deben a cepas del serogrupo B y varían en incidencia de 1-10/100.000/población total al año, alcanzando a veces valores mayores (Kaczmarek, E.B. (1997), *Commun. Dis. Rep. Rev.* 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. y col. *Clin. Infect. Dis.* 16: 237-246, 1993; Cruz, C, Pavez, G., Aguilar, E., y col. *Epidemiol.*

Infect. 105: 119-126, 1990). Las incidencias específicas de la edad en los dos grupos de riesgo mayor, los niños y adolescentes, alcanzan niveles mayores.

La epidemia dominada por el serogrupo A de meningococos ocurre principalmente en África central, alcanzando a veces niveles de hasta 1000/100.000/año (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V., *Clin. Microbiol. Rev.* 2 (Supplement), S18-S24, 1989). En conjunto, casi todos los casos de enfermedades meningocócicas son causadas por los serogrupos de meningococos A, B, C, W-135 e Y. Se encuentra disponible una vacuna de polisacárido capsular tetravalente de A, C, W-135, Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., *J. Biol. Stand.* 10: 335-339, 1982).

Actualmente, las vacunas de polisacáridos se están mejorando mediante la conjugación química de estos con proteínas vehículo (Lieberman, J.M., Chiu, S.S., Wong, V.K., y col. *JAMA* 275: 1499-1503, 1996). No hay disponible una vacuna del serogrupo B, puesto que el polisacárido capsular B no es inmunogénico, lo más probable porque comparte similitud estructural con los componentes del huésped (Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L. y col., *J. Infect. Dis.* 126: 514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Makela, P.M. *Lancet* ii.: 355-357, 1983).

Durante muchos años, los esfuerzos se han centrado en desarrollar vacunas basadas en la membrana externa meningocócica (de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C. y col. *Lancet* 340: 1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E.A. Gronnesby, J.K. y col. 338: 1093-1096, 1991). Dichas vacunas han demostrado eficacias de 57%-85% en niños más mayores (>4 años) y adolescentes. La mayoría de estos ensayos de eficacia se llevaron a cabo con vacunas de OMV (vesículas de la membrana externa, obtenidas por reducción drástica de las vesículas) obtenidas de cepas salvajes de *N. meningitidis* B.

El serogrupo B de *N. meningitidis* (menB) excreta vesículas de la membrana externa en cantidades que permiten su preparación a una escala industrial. Se ha encontrado que dichas vacunas de proteínas de la membrana externa multicomponentes de cepas de menB naturales, son eficaces para proteger a los adolescentes frente a la enfermedad por menB, y se han registrado en Latinoamérica. Un procedimiento alternativo para preparar vesículas de la membrana externa es por el procedimiento de extracción con detergente de las células bacterianas (documento EP 11243).

En estas vacunas, hay presentes muchos componentes de la membrana externa bacteriana, tales como PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB y la contribución de estos componentes a la protección observada todavía necesita una definición adicional. Se han definido otros componentes de la membrana externa bacteriana (usando anticuerpos animales o humanos) como que son potencialmente importantes para la inducción de la inmunidad protectora, tales 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. y col., *Inf. Immun.* 63: 884-890, 1995). El mecanismo de inmunidad protectora implicará la actividad bactericida mediada por anticuerpo y opsonofagocitosis.

Moraxella catarrhalis

Moraxella catarrhalis (también llamada *Branhamella catarrhalis*) es una bacteria Gram negativa aislada con frecuencia del tracto respiratorio superior humano. Es responsable de varias patologías, siendo las principales la otitis media en bebés y niños, y la neumonía en ancianos. También es responsable de la sinusitis, infecciones nosocomiales, y con menos frecuencia, de enfermedades invasivas.

Se han identificado anticuerpos bactericidas en la mayoría de los adultos ensayados (Chapman, A.J. y col. (1985) *J. Infect. Dis.* 151: 878). Las cepas de *M. catarrhalis* presentan variaciones en su capacidad de resistir la actividad bactericida del suero: (Hol, C. y col. (1993) *Lancet* 341:1281, Jordan, K.L. y col. (1990), *Am. J. Med.* 88 (suppl. 5A):28S). Por lo tanto, la resistencia del suero podría considerarse como un factor virulento de las bacterias. Se ha observado una actividad de opsonización en los sueros de niños que se recuperan de la otitis media.

No se han identificado los antígenos dirigidos por estas diferentes respuestas inmunitarias en seres humanos, con la excepción de OMP B1, una proteína de 84 kDa, cuya expresión es regulada por el hierro, y que es reconocida por los sueros de los pacientes con neumonía (Sethi, S. y col. (1995) *Infect. Immun.* 63:1516), y de UspA1 y UspA2 (Chen D. y col. (1999), *Infect. Immun.* 67:1310).

Se han caracterizado algunas proteínas de membrana más en la superficie de *M. catarrhalis* usando procedimientos bioquímicos por su potencial implicación en la inducción de una inmunidad protectora (para una revisión, véase Murphy, TF (1996) *Microbiol. Rev.* 60:267). En un modelo de neumonía de ratón, la presencia de anticuerpos contra algunos de ellos (UspA, CopB) favorece una eliminación más rápida de la infección pulmonar. Otro polipéptido (OMP CD) está muy conservado entre las cepas de *M. catarrhalis*, y presenta homologías con una porina de *Pseudomonas aeruginosa*, que se ha demostrado que es eficaz contra esta bacteria en modelos animales.

M. catarrhalis produce vesículas en la membrana exterior (vesículas). Estas vesículas se han aislado o extraído usando diferentes procedimientos. Entre estos procedimientos, se conocen bien la extracción con detergente (Bartos L.C. y Murphy T.M. 1988. *J. Infect. Dis.* 158: 761-765; Murphy T.M. y Loeb M.R. 1989 *Microbial Pathog.* 6:159-174; Unhanand M., Maciver I., Ramilo O., Arencibia-Mireles O., Argyle J.C., McCracken G.H., Hansen E.J. 1992. *J. Infect. Dis.* 165:644-650; Maciver I., Unhanand M., McCracken G.H. y Hansen E.J. 1993. *J. Infect. Dis.* 168: 469-472) o la producción de células fantasma (Lubitz W., y col. 1999. *J. Biotechnol.* 73:261-273; Eko F.O., y col. 1999. *Vaccine*

17: 1643-1649). La capacidad protectora de dichas preparaciones de vesículas se ha ensayado en un modelo murino de eliminación pulmonar de *M. catarrhalis*. Se ha mostrado que la inmunización activa con vacuna de vesículas o transferencia pasiva de anticuerpos anti-vesículas, induce una protección significativa en este modelo (Maciver I., Unhanand M., McCracken G.H. Jr., Hansen, E.J. 1993. *J. Infect. Dis.* 168: 469-472).

5 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae es una bacteria Gram negativa inmóvil. Su único huésped natural es el hombre. Los aislados de *H. influenzae* normalmente se clasifican según su cápsula de polisacáridos. Se han identificado 6 tipos capsulares diferentes denominados de “a” a “f”. Los aislados que no pueden aglutinarse con antisero contra uno de estos 6 serotipos se clasifican como no tipificables, y no expresan una cápsula.

H. influenzae de tipo b (Hib) es claramente diferente de los otros tipos en cuanto que es una causa principal de meningitis bacteriana y enfermedades sistémicas. Las cepas no tipificables de *H. influenzae* (NTHi) se aíslan solo a veces de sangre de pacientes con enfermedad sistémica. Las NTHi son una causa común de neumonía, exacerbación de la bronquitis crónica, sinusitis y otitis media. Las cepas de NTHi demuestran una gran variabilidad cuando se identifican por análisis clonal, mientras que las cepas Hib en conjunto son más homogéneas.

Se ha demostrado que diferentes proteínas de *H. influenzae* están implicadas en la patogénesis o se ha demostrado que confieren protección tras la vacunación en modelos animales.

Se ha descrito la adherencia de NTHi a células epiteliales nasofaríngeas humanas (Read RC. y col. 1991. *J. Infect. Dis.* 163:549). A parte de fimbrias y pilis (Brinton CC. y col. 1989. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8:S54; Kar S. y col. 1990. *Infect. Immun.* 58:903; Gildorf JR. y col. 1992. *Infect. Immun.* 60:374; St. Geme JW y col. 1991. *Infect. Immun.* 59:3366; St. Geme JW y col. 1993. *Infect. Immun.* 61: 2233), se han identificado muchas adhesinas en las NTHi. Entre ellas, se ha mostrado que dos proteínas de alto peso molecular expuestas en la superficie, denominadas HMW1 y HMW2, median la adhesión de NTHi a las células epiteliales (St. Geme JW. y col. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2875). Se ha identificado otra familia de proteínas de alto peso molecular en las cepas de NTHi que carecen de proteínas que pertenecen a la familia HMW1/HMW2. La proteína Hia de 115 kDa de NTHi (Barenkamp SJ., St Geme S.W. 1996. *Mol. Microbiol.* Pendiente de publicación) es muy similar a la adhesina Hsf expresada por las cepas de tipo b de *H. influenzae* (St. Geme JW. y col. 1996. *J. Bact.* 178:6281). Otra proteína, la proteína Hap presenta similitudes con las serina proteasas IgA1 y se ha mostrado que está implicada tanto en la adhesión como en la entrada celular (St. Geme JW. y col. 1994. *Mol. Microbiol.* 14:217).

Se han identificado 5 proteínas de membrana exterior (OMP) principales y se han nombrado numéricamente. Los estudios originales usando cepas de tipo b de *H. influenzae* mostraron que los anticuerpos específicos para las OMP P1 y P2 protegían ratas bebés de la posterior estimulación (Loeb MR. y col. 1987. *Infect. Immun.* 55:2612; Musson RS. Jr. y col. 1983. *J. Clin. Invest.* 72:677). Se encontró que P2 podía inducir anticuerpos bactericidas y opsónicos, que se dirigen contra las regiones variables presentes en estructuras de bucle expuestas en la superficie de esta OMP integral (Haase EM. y col. 1994 *Infect. Immun.* 62:3712; Troelstra A. y col. 1994 *Infect. Immun.* 62:779). La lipoproteína P4 también puede inducir anticuerpos bacterianos (Green BA. y col. 1991. *Infect. Immun.* 59:3191).

La OMP P6 es una lipoproteína conservada asociada a péptidoglucano que compone hasta 1-5% de la membrana externa (Nelson MB. y col. 1991. *Infect. Immun.* 59:2658). Más tarde, se reconoció una lipoproteína de aproximadamente el mismo peso molecular llamada PCP (proteína de reactividad cruzada P6) (Deich RM. y col. 1990. *Infect. Immun.* 58:3388). Una mezcla de las lipoproteínas conservadas P4, P6 y PCP no puso de manifiesto protección cuando se midió en un modelo de otitis media de chinchilla (Green BA. y col. 1993. *Infect. Immun.* 61:1950). Parece que P6 sola induce protección en el modelo de chinchilla (Demaria TF. y col. 1996. *Infect. Immun.* 64:5187).

También se ha descrito una proteína fimbrina (Miyamoto N., Bakaletz, LO. 1996. *Microb. Pathog.* 21:343) con homología con OMP P5, la cual tiene homología de secuencia con OmpA integral de *Escherichia coli* (Miyamoto N., Bakaletz, LO. 1996. *Microb. Pathog.* 21:343; Munson RS. Jr. y col. 1993. *Infect. Immun.* 61:1017). Parece que NTHi se adhiere al moco mediante las fimbrias.

En línea con las observaciones hechas con gonococos y meningococos, NTHi expresa un receptor de transferrina humana doble compuesto de TbpA y TbpB, cuando se hace crecer con limitación de hierro. El anticuerpo anti-TbpB protegía a las ratas bebés (Loos-more SM. y col. 1996. *Mol. Microbiol.* 19:575). También se ha descrito un receptor de hemoglobina/haptoglobina para NTHi (Maciver I. y col. 1996. *Infect. Immun.* 64:3703). También se ha identificado un receptor de Hemo:Hemopexina (Cope LD. y col. 1994. *Mol. Microbiol.* 13:868). También hay un receptor de lactoferrina presente entre las NTHi, pero todavía no se ha caracterizado (Schryvers AB. y col. 1989. *J. Med. Microbiol.* 29:121). No se ha descrito una proteína similar a la proteína FrpB de *Neisseria* entre las NTHi.

Una OMP de 80 kDa, el antígeno de superficie D 15, proporciona protección contra la NTHi en un modelo de estimulación de ratón (Flack FS. y col. 1995. *Gene* 156:97). Una lipoproteína de membrana externa de 42 kDa, LPD se conserva entre *Haemophilus influenzae* e induce anticuerpos bacterianos (Akkoyunlu M. y col. 1996. *Infect. Immun.* 64:4586). Se encontró que una OMP minoritaria de 98 kDa (Kimura A. y col. 1985. *Infect. Immun.* 47:253), era un antígeno protector, esta OMP puede ser bien una de las OMP inducible con limitación de Fe o adhesinas de peso molecular alto que se han caracterizado después. *H. Influenzae* produce actividad de proteasa IgA1 (Mulks MH.,

Shoberg RJ. 1994. *Meth. Enzymol.* 235:543). La proteasa IgA1 de NTHi tiene un grado alto de variabilidad antigénica (Lomholt H., van Alphen L., Kilian, M. 1993. *Infect. Immun.* 61:4575).

Se ha mostrado que otra OMP de NTHi, OMP26, una proteína de 26 kDa potencia la depuración pulmonar en un modelo de rata (Kyd, J.M., Cripps, A.W. 1998. *Infect. Immun.* 66:2272). También se ha mostrado que la proteína HtrA de NTHi es un antígeno protector. Realmente, esta proteína protegía a la chinchilla frente a la otitis media y protegía a los bebés de rata frente a la bacteriemia de tipo b de *H. influenzae* (Loosmore S.M. y col. 1998. *Infect. Immun.* 66:899).

Se han aislado vesículas (o vesículas) de la membrana externa 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), que tenían la producción de células fantasma (Lubitz W., y col. 1999. *J. Biotechnol.* 73: 261-273; Eko F.O., y col. 1999. *Vaccine* 17:1643-1649). Las vesículas se han asociado con la inducción de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Wi-wpelwey B., Hansen E.J., Scheld W.M. 1989 *Infect. Immun.* 57: 2559-2560), la inducción de inflamación meníngea (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) y la absorción de ADN (Concino M.F., Goodgal S.H. 1982 *J. Bacteriol.* 152: 441-450). Estas vesículas pueden unirse y ser absorbidas por el epitelio de la mucosa nasal (HaradaT., ShimuzuT., Nishimoto K., Sakakura Y. 1989. *Acta Otorhinolarygol.* 246:218-221) mostrando que las adhesinas y/o los factores de colonización podían estar presentes en las vesículas. Se ha observado la respuesta inmunitaria a proteínas en vesículas de la membrana exterior en pacientes con diferentes enfermedades por *H. influenzae* (Sakakura Y., Harada T., Hamaguchi Y., Jin C.S. 1988. *Acta Otorhinolarygol. Suppl.* (Stockh.) 454: 222-226; Harada T., Sakakura Y., Miyoshi Y. 1986. *Rhinology* 24: 61-66).

Pseudomonas aeruginosa

El género *Pseudomonas* consta de bacilos Gram negativos rectos y ligeramente curvados, con flagelos polares, que crecen aeróbicamente y no forman esporas. Debido a sus requisitos metabólicos limitados, la especie *Pseudomonas* es ubicua y está ampliamente distribuida en el suelo, el aire, aguas residuales y en las plantas. Numerosas especies de *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, *P. pseudomallei*, *P. mallei*, *P. maltophilia* y *P. cepacia* también han demostrado ser patógenos para los seres humanos. Entre esta lista, *P. aeruginosa* se considera un patógeno humano importante puesto que está asociado con la infección oportunista del huésped inmunocomprometido y es responsable de una alta morbilidad en pacientes hospitalizados. Las infecciones nosocomiales con *P. aeruginosa* afectan principalmente a pacientes sometidos a tratamientos prolongados y que reciben agentes inmunosupresores, corticoesteroides, antibióticos antimetabolitos o radiación.

Las *Pseudomonas* y en particular *P. aeruginosa*, producen una variedad de toxinas (tales como hemolisinas, fibrinolisin, esterasas, coagulasas, fosfolipasas, endo y exotoxinas) que contribuyen a la patogenicidad de estas bacterias. Además, estos organismos tienen una alta resistencia intrínseca a los antibióticos debido a la presencia de bombas de eflujo de múltiples fármacos. Esta última característica complica a menudo el resultado de la enfermedad.

Debido al uso incontrolado de los productos quimioterapéuticos antibacterianos, ha aumentado considerablemente la frecuencia de la infección nosocomial por *P. aeruginosa* a lo largo de los últimos 30 años. En EE.UU., por ejemplo, la carga económica de la infección nosocomial por *P. aeruginosa* se calcula que es 4,5 mil millones de dólares anuales. Por lo tanto, es muy necesario el desarrollo de una vacuna para la inmunización activa o pasiva contra *P. aeruginosa* (para una revisión véase Stanislavsky y col. 1997. *FEMS Microbiol. Lett.* 21:243-277).

Diferentes antígenos secretados y asociados a células de *P. aeruginosa* han sido objeto del desarrollo de vacunas. Entre los antígenos de *Pseudomonas*, se encontró que la sustancia mucoide, que es un limo extracelular que consiste predominantemente en alginato, era heterogénea en términos de tamaño e inmunogenicidad. Los componentes del alginato de masa molecular alta (30-300 kDa) parece que contienen epítomos conservados mientras que los componentes del alginato de masa molecular menor (10-30 kDa) tienen epítomos conservados además de epítomos únicos. También se ha mostrado que entre las proteínas asociadas a la superficie, PrcV, que es parte del aparato de secreción-translocación de tipo III, también es un objetivo interesante para la vacunación (Sawa y col. 1999. *Nature Medicine* 5:392-398).

Los antígenos expuestos en la superficie, incluyendo los antígenos O (polisacárido O-específico de LPS) o antígenos H (antígenos flagelares) se han usado para el serotipo debido a su naturaleza inmunógena. Se han elucidado las estructuras químicas de las unidades que se repiten de polisacáridos O-específicos y estos datos han permitido la identificación de 31 quimiotipos de *P. aeruginosa*. Los epítomos conservados entre todos los serotipos de *P. aeruginosa* se encuentran en el núcleo de oligosacárido y la región de lípido A de los LPS e inmunógenos que contienen estos epítomos inducen inmunidad protectora cruzada en ratones contra diferentes inmunotipos de *P. aeruginosa*. El núcleo exterior de los LPS se implicó como un ligando para la unión de *P. aeruginosa* a células epiteliales de la vía aérea y ocular de animales. Sin embargo, existe heterogeneidad en esta región del núcleo exterior entre los diferentes serotipos. Los epítomos en el núcleo interior son muy conservados y se ha demostrado que son accesibles a la superficie y no están enmascarados por el polisacárido O-específico.

Para examinar las propiedades protectoras de las proteínas OM, se ha usado una vacuna que contiene proteínas OM de *P. aeruginosa* de masas moleculares en el intervalo de 20 a 100 kDa, en ensayos preclínicos y clínicos. Esta

vacuna era eficaz en modelos animales contra la estimulación por *P. aeruginosa* e inducía niveles altos de anticuerpos específicos en voluntarios humanos. Los plasmas de voluntarios humanos que contenían anticuerpos anti- *P. aeruginosa* proporcionaron protección pasiva y ayudaron a la recuperación de 87% de los pacientes con formas graves de infección por *P. aeruginosa*. Más recientemente, se demostró que una proteína híbrida que contenía partes de las proteínas de la membrana externa OprF (aminoácidos 190-342) y OprI (aminoácidos 21-83) de *Pseudomonas aeruginosa* fusionada con la glutatión-S-transferasa, protegía a ratones contra una dosis 975 veces la dosis letal de 50% de *P. aeruginosa* (Knapp y col. 1999. *Vaccine*. 17:1663-1669).

Sin embargo, la purificación de vesículas es técnicamente difícil; la producción de vesículas en la mayoría de las cepas Gram negativas da rendimientos bajos del producto para la producción industrial de vacunas, y a menudo un producto muy heterogéneo. La presente invención resuelve este problema proporcionando cepas “formadoras de hipervesículas” especialmente modificadas, a partir de las cuales se pueden hacer vesículas más fácilmente con mayor rendimiento y pueden ser de naturaleza más homogénea. Dichas vesículas también pueden esterilizarse por filtración más fácilmente.

Además, si la bacteria hace más vesículas de forma natural, hay considerables ventajas en el procedimiento asociadas con la purificación de vesículas en cuanto que las vesículas se pueden hacer y recoger sin usar detergentes tales como desoxicolato (para la extracción de cantidades mayores de vesículas). Esto significaría que se podrían obviar etapas del procedimiento habituales para eliminar el detergente, tales como la purificación por cromatografía y la ultracentrifugación.

Breve descripción de los dibujos

la fig. 1 es un alineamiento múltiple de proteínas asociadas a péptidoglucanos. EC es *E. coli*, HI es *Haemophilus influenzae*, NG es *Neisseria gonorrhoeae*. ↑ indica la posición del resto F conservado de homólogos de OmpA que deberían estar conservados en truncados C-terminales. _____ indica la extensión totalmente conservada del sitio de asociación de péptidoglucanos;

la fig. 2 es un alineamiento múltiple de proteínas asociadas a péptidoglucanos. EC es *E. coli*, MC es *Moraxella catarrhalis*, NG es *Neisseria gonorrhoeae*. ↑ indica la posición del resto F conservado de homólogos de OmpA que deberían estar conservados en truncados C-terminales. _____ indica la extensión totalmente conservada del sitio de asociación de péptidoglucanos;

la fig. 3 muestra una estructura esquemática hipotética de ompCD de *M. catarrhalis*. Se muestra la posición del resto F de homólogos de OmpA que deberían estar conservado en truncados C-terminales, ya que es el sitio de asociación de péptidoglucanos;

la fig. 4 muestra el cribado por PCR de *Neisseria* recombinante resultante de un cruzamiento doble en el sitio *omp* como se describe en el ejemplo 1;

la fig. 5 es una representación esquemática de la estrategia usada para construir los plásmidos mutadores para la delección de genes *tol* en *Moraxella catarrhalis* y NTHi;

la fig. 6 es una representación esquemática de *Moraxella catarrhalis tolQR* recombinante doble esperada. B: análisis por PCR de clones recombinantes de *Moraxella catarrhalis tol QR* usando los cebadores E, F, G y H

la fig. 7 es la construcción de plásmidos mutadores usados para introducir un codón de parada en la secuencia *ompCD* y la secuencia *P5* de *Moraxella catarrhalis* y NTHi respectivamente.

Descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas que se ha modificado genéticamente por uno o ambos procedimientos seleccionados de un grupo que consiste en: reducción de la expresión de uno o más genes *tol*; y mutación de uno o más genes que codifican una proteína que comprende un sitio asociado a péptidoglucanos, para atenuar la actividad de unión a péptidoglucanos de la o las proteínas.

Por “formadora de hipervesículas” se entiende que la bacteria de forma natural libera 2 o más veces (más preferiblemente 3, 4, 5 o 10 o más veces) la cantidad de vesículas de la bacteria no modificada.

Por “reducción de la expresión” y “que reduce la expresión” se entiende que se reduce la expresión del gen en cuestión (en al menos 2 veces, preferiblemente 5 veces o más) o se para completamente. Esto se puede hacer fácilmente mediante procedimientos tales como la delección del gen del genoma, introducción de un codón de parada en la secuencia codificante del gen, delección de la secuencia promotora del gen, o sustitución de la secuencia promotora del gen por un promotor más débil. Cuando el gen es un operón (como lo son muchos de los genes *tol*) se debe tener cuidado de asegurar que la reducción de la expresión del gen objetivo no afecte a la expresión de los otros genes en el operón de los que no se pretende reducir la expresión.

Los genes *tol* específicos se pueden identificar en diferentes bacterias Gram negativas por homología (preferiblemente más de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% de identidad o más) con los genes *tol* descritos en el presente documento (por ejemplo *tolA*, *B*, *Q* o *R*), o los de *E. coli*. Preferiblemente, se reduce la expresión de 1, 2, 3, 4 ó 5 genes *tol* en la bacteria de la invención. Lo más preferiblemente, se reduce la expresión de parejas de genes *tol*: *tolQ* y *tolR*, o *tolR* y *tolA* (preferiblemente por delección o introducción de un codón de alteración) en una bacteria.

Por “mutación” de uno o más genes que codifican una proteína que comprende un sitio asociado a péptidoglucanos para atenuar la actividad de unión a péptidoglucanos de la o las proteínas, se entiende que se “reduce la expresión” de dichos genes como se ha descrito antes. Alternativamente, debido a que dichos genes pueden codificar antígenos protectores, se puede introducir un codón de parada en o 5’ respecto de la parte del gen que codifica el sitio de asociación a péptidoglucanos (un péptido de aproximadamente 16-22 aminoácidos que está conservado y se puede identificar entre las cepas bacterianas Gram negativas, como se muestra en las figuras 1 y 2, o secuencias de aminoácidos 40, 50, 60, 70, 80, 90% o más, idénticas a dichas secuencias).

Con frecuencia dichos genes son proteínas de membrana integrales, y por lo tanto es preferible que el codón de parada esté en 3’ respecto de la parte del gen que codifica la parte asociada a la membrana externa de la proteína, y 5’ respecto del sitio de asociación de péptidoglucanos. Se ha visto que para proteínas homólogas a OmpA, dicho codón de parada estaría situado 3’ respecto de un codón que codifica un resto F conservado (como se indica en las fig. 1 y 2, y esquemáticamente en la fig. 3). Este resto conservado F debería estar retenido con el fin de asegurar el plegamiento adecuado de la proteína truncada en la membrana externa. Los truncados C-terminales de los homólogos de OmpA (y genes que los codifican) que retienen este resto F conservado (cuya identidad se puede determinar fácilmente por comparación de un homólogo OmpA con la secuencia de emparejamiento de las figuras 1 y 2) son un aspecto adicional de esta invención.

Cuando la región del gen 3’ de la región que codifica el sitio de asociación de péptidoglucanos se va a retener (por ejemplo, si codifica un epítipo protector [por ejemplo en el caso de P5 de *H. influenzae*]), el sitio de asociación de péptidoglucanos se puede diseñar mediante 1, 2, 3, 4, 5 ó más mutaciones puntuales, o por delección de aminoácidos (preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 ó 15 aminoácidos o el conjunto del sitio de asociación de péptidoglucanos) del sitio de asociación de péptidoglucanos, de modo que se atenúa la actividad de asociación a péptidoglucanos de la proteína (se reduce al menos 2 veces, preferiblemente se elimina totalmente) hasta el nivel deseado.

Para el propósito de esta invención el “sitio de asociación de péptidoglucanos” significa la región de una proteína que se asocia a péptidoglucanos que se puede alinear con los sitios de asociación de péptidoglucanos marcados en las figuras 1 y 2 (regiones encuadradas o subrayadas).

Los sucesos de reducción de la expresión y mutación anteriores en el genoma bacteriano, los pueden llevar a cabo expertos en la materia usando recombinación homóloga (como se describe en los ejemplos y en el documento WO 01/09350). Para esta técnica, deben conocerse al menos 50-100 nucleótidos (preferiblemente aproximadamente 500) de cada lado del área de cambio.

Esta invención no pretende cubrir las bacterias que albergan mutaciones (p. ej., noqueados) del sitio *minB*, salvo que la bacteria se haya modificado también por uno o ambos de los procedimientos anteriores de la invención.

Neisseria

En una realización la bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas se modificó genéticamente por reducción de la expresión de uno o ambos de los siguientes genes: *exbB* (homólogo de *tolQ*) [SEQ ID NO: 1] y *exbD* (homólogo de *tolR*) [SEQ ID NO: 3]. La región secuencia arriba de *exbB* y *exbD* se proporciona en los SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente, y es útil para designar vectores de recombinación homólogos para la reducción de la expresión del gen (por ejemplo por delección del promotor o sustitución del mismo por una más débil, o un promotor controlado por metabolito [p. ej., el promotor *phoE* de *E. coli*]).

En una realización adicional la cepa de *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas se ha modificado genéticamente (de forma aislada o combinada con los sucesos de reducción de la expresión anteriores) por mutación de *rmpM* [SEQ ID NO: 7 ó 9] para atenuar la actividad de unión a péptidoglucanos de la proteína codificada. El sitio de asociación de péptidoglucanos para la proteína se puede ver en la figura 1 (y tiene la secuencia de aminoácidos NQALSERRAYVVANNLVS - véase también el SEQ ID NO: 8). La región secuencia arriba del gen se proporciona en el SEQ ID NO: 10 que es útil para la reducción de la expresión del gen. Preferiblemente, el gen se muta de la forma descrita en el ejemplo 1. Si se hace un truncado, se prefiere introducir el codón de parada secuencia abajo del codón que codifica el resto F conservado indicado en las figuras 1 y 2.

Las vesículas preparadas a partir de dichas cepas modificadas pueden tener una o más de las siguientes mejoras: menor tamaño de partículas (que permite la esterilización por filtración a través de poros de 0,22 μm), una mayor homogeneidad del lote y rendimiento superior. Este tipo de alteraciones de la morfología de las vesículas se obtiene por manipulación de genes en la unión de la membrana externa a la capa de péptidoglucanos y/o a la membrana citoplasmática como se ha descrito antes. La liberación natural de vesículas mejorada tiene la ventaja de que las vesículas se pueden aislar en cantidades industriales sin el uso de detergentes tales como desoxicolato.

Mejoras adicionales en las bacterias y vesículas de la invención

La bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas se puede diseñar además genéticamente mediante uno o más procedimientos seleccionados del siguiente grupo: (a) un procedimiento de reducción de la expresión de antígenos inmunodominantes variables o no protectores, (b) un procedimiento de aumento de la expresión de antígenos OMP protectores, (c) un procedimiento de reducción de la expresión de un gen implicado en hacer tóxica la parte de lípido A del LPS, (d) un procedimiento de aumento de la expresión de un gen implicado en hacer menos tóxica la parte de lípido A del LPS, y (e) un procedimiento de reducción de la síntesis de un antígeno que comparte similitud estructural con una estructura humana y puede inducir una respuesta autoinmune en seres humanos.

Dichas vacunas de vesículas de la invención se diseñan para centrarse en la respuesta inmunitaria de unos pocos antígenos o epítomos protectores (preferiblemente conservados), formulados en una vacuna de múltiples componentes. Cuando dichos antígenos son OMP integrales, las vesículas de la membrana externa de las vacunas de vesículas aseguran su plegamiento adecuado. Esta invención proporciona procedimientos para optimizar la composición en OMP y LPS de vacunas UMV (vesículas) por delección de la variable inmunodominante así como de OMP no protectoras, creando OMP conservadas por delección de regiones variables, por aumento de la expresión de OMP protectoras, y por eliminación de mecanismos de control para la expresión (tales como restricción de hierro) de OMP protectoras. Además, la invención proporciona la reducción de toxicidad del lípido A por modificación de la parte lipídica o cambiando la composición de fosforilos, mientras que retiene la actividad adyuvante, o por enmascaramiento. Cada uno de estos procedimientos nuevos de mejora, mejoran individualmente la vacuna de vesículas, sin embargo una combinación de uno o más de estos procedimientos trabajan juntos para producir una vacuna de vesículas optimizada por ingeniería que es inmunoprotectora y no tóxica, en particular adecuada para uso pediátrico.

(a) Un procedimiento de reducción de la expresión de antígenos inmunodominantes variables o no protectores

Muchos antígenos de superficie son variables entre las cepas bacterianas y como consecuencia son protectores solo contra un grupo limitado de cepas estrechamente relacionadas. Un aspecto de esta invención cubre la reducción de la expresión, o preferiblemente la delección del gen o genes que codifican proteínas de superficie variables, que da como resultado una cepa bacteriana que produce vesículas que, cuando se administran en una vacuna, tienen un potencial mayor de reactividad cruzada contra diferentes cepas debido a una mayor influencia ejercida por las proteínas conservadas (retenidas en la membranas externas) en el sistema inmunitario de los vacunados. Los ejemplos de dichos antígenos variables incluyen: para *Neisseria* - pili(PilC) que sufre variaciones antigénicas, PorA, Opa, TbpB, FrpB.

Otros tipos de genes de los que se podría reducir o parar la expresión son genes que, *in vivo*, la bacteria puede expresar o no. Puesto que las proteínas de la membrana externa codificadas por dichos genes no siempre están presentes en la bacteria, la presencia de dichas proteínas en las preparaciones de vesículas también puede ser perjudicial para la eficacia de la vacuna por las razones expuestas antes. Un ejemplo preferido de reducción de la expresión o delección, es la proteína Opc de *Neisseria*. La inmunidad anti-Opc inducida por una vacuna de vesículas que contienen Opc solo tendría una capacidad protectora limitada ya que el organismo infeccioso podría convertirse fácilmente en Opc". HgpA y HgpB de *H. influenzae* son otros ejemplos de dichas proteínas.

En el procedimiento a), se reduce la expresión de estos genes variables o no protectores, o se para definitivamente. Esto tiene la sorprendente ventaja de concentrar en el sistema inmunitario antígenos mejores que están presentes en pequeñas cantidades en la superficie exterior de las vesículas.

La cepa se puede diseñar de esta forma mediante una serie de estrategias que incluyen la inserción de transposón para alterar la región codificante o región promotora del gen, o mutaciones puntuales o delecciones para lograr un resultado similar. También se puede usar la recombinación homóloga para suprimir un gen de un cromosoma (cuando la secuencia X comprende parte (preferiblemente toda) la secuencia codificante del gen de interés). Además se puede usar para cambiar su promotor fuerte por un promotor más débil (o sin promotor). Todas estas técnicas se describen en el documento WO 01/09350 (publicado por WIPO el 8/2/01).

(b) Un procedimiento de aumento de la expresión de antígenos OMP protectores

Esto se puede hacer insertando una copia de dicha OMP protectora en el genoma (preferiblemente por recombinación homóloga) o aumentando la expresión del gen nativo y sustituyendo el promotor nativo por un promotor más fuerte, o insertando un promotor fuerte secuencia arriba del gen en cuestión (también por recombinación homóloga). Dichos procedimientos se pueden llevar a cabo usando las técnicas descritas en el documento WO 01/09350 (publicado por WIPO el 8/2/01).

Dichos procedimientos son particularmente útiles para potenciar la producción de componentes de las vesículas inmunológicamente relevantes tales como proteínas de la membrana externa y lipoproteínas (preferiblemente OMP conservadas, normalmente presentes en vesículas en concentraciones bajas).

(c) Un procedimiento de reducción de la expresión de un gen implicado en hacer tóxica la parte de lípido A del LPS

La toxicidad de las vacunas de vesículas es uno de los mayores problemas en el uso de las vacunas de vesículas. Un aspecto adicional de la invención se refiere a procedimientos de detoxificación genética de LPS presentes en las

vesículas. El lípido A es el componente principal de los LPS responsable de la activación celular. Muchas mutaciones en genes implicados en esta ruta conducen a fenotipos esenciales. Sin embargo, las mutaciones en los genes responsables de las etapas de modificaciones terminales conducen a fenotipos sensibles a la temperatura (*htrB*) o permisivos (*msbB*). Las mutaciones que dan como resultado una disminución (o no) de la expresión de estos genes dan como resultado la actividad tóxica del lípido A alterada. Realmente, el lípido A no lauroilado (mutante *htrB*) [también definido por los LPS resultantes que carecen de ambas cadenas de acilo secundarias] o no miristoilado (mutante *msbB*) [también definido por los LPS resultantes que carecen solo de una sola cadena de acilo secundario] son menos tóxicos que el lípido A salvaje. Las mutaciones en la lípido A 4'-quinasa que codifica el gen (*lpxK*) también disminuye la actividad tóxica del lípido A.

Por lo tanto, el procedimiento c) implica la delección de parte (o preferiblemente todos) de uno o más de los marcos de lectura abiertos o promotores anteriores. Alternativamente, los promotores se podrían sustituir por promotores más débiles. Preferiblemente, se usan técnicas de recombinación homóloga para llevar a cabo el procedimiento. Preferiblemente los procedimientos se describen en el documento WO 01/09350 (publicado por WIPO el 8/2/01). Las secuencias de los genes *htrB* y *msbB* de *Neisseria meningitidis* B, *Moraxella catarrhalis*, y *Haemophilus influenzae* se proporcionan en el documento WO 01/09350 para este propósito.

(d) *Un procedimiento de aumento de la expresión de un gen implicado en hacer menos tóxica la parte de lípido A del LPS*

La actividad tóxica de los LPS también se podría alterar introduciendo mutaciones en genes/sitios implicados en la resistencia a la polimixina B (dicha resistencia se ha correlacionado con la adición de aminoarabinosa en el fosfato 4' del lípido A). Estos genes/sitios podrían ser *pmrE* que codifica una UDP-glucosa deshidrogenasa, o una región de genes de resistencia a péptidos antimicrobianos común a muchas enterobacterias, que podría estar implicada en la síntesis y transferencia de aminoarabinosa. El gen *pmrF* que está presente en esta región codifica una dolicol-fosfato manosil transferasa (Gunn J.S., Kheng, B.L., Krueger J., Kim K., GuoL, HackettM., Miller S.I. 1998. *Mol. Microbiol.* 27: 1171-1182).

Las mutaciones en el sistema regulador de PhoPhoQ, que es un sistema regulador de dos componentes de fosfotransmisión (fenotipo constitutivo Pho, PhoP^c), o condiciones de cultivo o del entorno de Mg⁺⁺ bajo (que activan el sistema regulador PhoP-PhoQ) conducen a la adición de la aminoarabinosa en el fosfato 4' y al 2-hidroximiristato que sustituye al miristato (hidroxilación de miristato). Este lípido A modificado reduce la capacidad para estimular la expresión de E-selectina por las células endoteliales humanas y la secreción de TNF- α de monocitos humanos.

El procedimiento d) implica el aumento de la expresión de esos genes usando una estrategia descrita en el documento WO 01/09350 (publicado por WIPO el 8/2/01).

(e) *Un procedimiento de reducción de la síntesis de un antígeno que comparte una similitud estructural con una estructura humana y puede ser capaz de inducir una respuesta autoinmunitaria en seres humanos*

El aislamiento de vesículas de la membrana externa bacteriana de bacterias Gram negativas encapsuladas, a menudo da como resultado la copurificación del polisacárido capsular. En algunos casos, este material "contaminante" puede ser útil, puesto que el polisacárido puede potenciar la respuesta inmunitaria conferida por otros componentes de la vesícula. Sin embargo, en otros casos, la presencia del material polisacárido contaminante en las preparaciones de vesículas bacterianas puede ser perjudicial para el uso de las vesículas en una vacuna. Por ejemplo, se ha mostrado que al menos en el caso de *N. meningitidis* el polisacárido capsular del serogrupo B no confiere inmunidad protectora y es susceptible de inducir una respuesta autoinmunitaria adversa en seres humanos. Por consiguiente, el procedimiento e) de la invención es el diseño de la cepa bacteriana para la producción de vesículas desprovistas de polisacáridos capsulares. Las vesículas serán entonces adecuadas para usar en seres humanos. Un ejemplo particularmente preferido de dicha preparación de vesículas es una de *N. meningitidis* del serogrupo B desprovista de polisacárido capsular.

Esto se puede lograr usando cepas de producción de vesículas modificadas, en las que los genes necesarios para la biosíntesis y/o exportación capsular se han alterado como se describe en el documento WO 01/09350 (publicado por WIPO el 8/2/01, e incorporado en el presente documento por referencia). Un procedimiento preferido es la delección de algunos o todos los genes *cps* de *Neisseria meningitidis* necesarios para la biosíntesis y exportación del polisacárido. Para este propósito, se puede usar la sustitución del plásmido pMF121 (descrito en Frosh y col.1990, *Mol. Microbiol.* 4:1215-1218) para dar una mutación que suprime el grupo de genes *cpsCAD* (+ *galE*). Alternativamente, podría suprimirse o reducir la expresión del gen *siaD* (el gen *siaD* meningocócico codifica la alfa-2,3-sialiltransferasa, una enzima necesaria para el polisacárido capsular y la síntesis de LOS). Dichas mutaciones también pueden eliminar estructuras similares del huésped en la parte de sacárido del LPS de la bacteria.

Combinaciones de los procedimientos a) - e)

Se puede observar que se puede usar uno o más de los procedimientos anteriores para producir una cepa modificada a partir de la cual hacer preparaciones de vesículas mejoradas de la invención. Preferiblemente, se usa uno de dichos procedimientos, más preferiblemente se usan dos o más (2, 3, 4 ó 5) de los procedimientos con el fin de fabricar

vacunas de vesículas. Cuando se usan procedimientos adicionales en la fabricación de la vacuna de vesículas, cada mejora trabaja conjuntamente con los otros procedimientos usados con el fin de hacer una preparación de vesículas diseñada optimizada.

Una preparación de vesículas meningocócicas (en particular *N. meningitidis* B) preferida comprende el uso de los procedimientos b), c) y e) (opcionalmente combinados con el procedimiento a)). Dichas preparaciones de vesículas son seguras (no hay estructuras similares a las estructuras del huésped), no tóxicas y estructuradas de forma que la respuesta inmunitaria del huésped estará centrada en los altos niveles de antígenos protectores (y preferiblemente conservados). Todos los elementos anteriores trabajan juntos con el fin de proporcionar una vacuna de vesículas optimizada.

Igualmente, para *M. catarrhalis*, *H. influenzae* no tipificable, y cepas meningocócicas no de serotipo B (p. ej., serotipo A, C, Y o W), las preparaciones de vesículas preferidas comprenden el uso de los procedimientos b) y c), opcionalmente combinados con el procedimiento a).

Preparaciones preferidas de vesículas de *Neisseria*

Se prefieren uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) para el aumento de la expresión mediante el procedimiento b) cuando se lleva a cabo en una cepa de *Neisseria*, incluyendo genococos y meningococos (en particular, *N. meningitidis* B): NspA (WO 96/29412), Hsf-like (WO 99/31132), Hap (PCT/EP99/02766), PorA, PorB, OMP85 (WO 00/23595), PilQ (PCT/EP99/03603), PldA (PCT/EP99/06718), FrpB (WO 96/31618), TbpA (US 5.912.336), TbpB, FrpA/FrpC (WO 92/01460), LbpA/LbpB (PCT/EP98/05117), FhaB (WO 98/02547), HasR (PCT/EP99/105989), lipo02 (PCT/EP99/08315), Tbp2 (WO 99/57280), MltA (WO 99/57280), y ctrA (PCT/EP00/00135). También se prefieren genes que se pueden introducir de forma heteróloga en otras bacterias Gram negativas.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para la reducción de la expresión por el procedimiento a): PorA, PorB, PilC, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, Opa, y Ope (lo más preferiblemente PorA).

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para la reducción de la expresión por el procedimiento c): htrB, msbB y lpxK (lo más preferiblemente msbB que elimina una sola cadena de acilo secundaria de la molécula de LPS).

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para el aumento de la expresión por el procedimiento d): pmrA, pmrB, pmrE, y pmrF.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para la reducción de la expresión por el procedimiento e): galE, siaA, siaB, siaC, siaD, ctrA, ctrB, ctrC, y ctrD (los genes se describen en el documento WO 01/09350 - publicado por WIPO el 8/2/01).

Preparaciones preferidas de vesículas de *Pseudomonas aeruginosa*

Se prefiere uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) para el aumento de la expresión por el procedimiento b): PcrV, OprF, OprI. También se prefieren genes que se pueden introducir de forma heteróloga en otras bacterias Gram negativas.

Preparaciones de vesículas de *Moraxella catarrhalis* preferidas

Se prefiere uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) para el aumento de la expresión por el procedimiento b): OMP106 (documentos WO 97/41731 y WO 96/34960), HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85 (PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977.2), lipo10 (GB 9918208.1), lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038), ompCD, CopB (Helminen ME, y col. (1993) *Infect. Immun.* 61:2003-2010), D15 (PCT/EP99/03822), OmpA1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), LbpA y LbpB (WO 98/55606), TbpA y TbpB (WO 97/13785 y WO 97/32980), OmpE, UspA1 y UspA2 (WO 93/03761), FhaB (WO 99/58685) y Omp21. También se prefieren genes que se pueden introducir de forma heteróloga en otras bacterias Gram negativas.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para la reducción de la expresión por el procedimiento a): CopB, OMP106, OmpB1, TbpA, TbpB, LbpA, y LbpB.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para la reducción de la expresión por el procedimiento c): htrB, msbB y lpxK (lo más preferiblemente msbB).

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para el aumento de la expresión por el procedimiento d): pmrA, pmrB, pmrE, y pmrF.

Preparaciones preferidas de vesículas de *Haemophilus influenzae*

Se prefiere uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) para el aumento de la expresión por el procedimiento b): D15 (WO 94/12641), P6 (EP 281673), TbpA, TbpB, P2, P5 (WO 94/26304), OMP26 (WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hsf, Hap, Hin47, Iomp1457 (GB 0025493.8), YtfN (GB

ES 2 327 496 T3

0025488.8), VirG (GB 0026002.6), Iomp1681 (GB 0025998.6), OstA (GB 0025486.2) y Hif (debe aumentarse la expresión de todos los genes en este operón con el fin de aumentar la expresión de la pilina). También se prefieren genes que se pueden introducir de forma heteróloga en otras bacterias Gram negativas.

- 5 Se prefiere uno o más de los siguientes genes para la reducción de la expresión por el procedimiento a): P2, P5, Hif, IgA1-proteasa, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, TbpA, y TbpB.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para la reducción de la expresión por el procedimiento c): htrB, msbB y lpxK (lo más preferiblemente msbB).

- 10 Se prefiere uno o más de los siguientes genes para el aumento de la expresión por el procedimiento d): pmrA, pmrB, pmrE y pmrF.

Preparaciones de vesículas de membrana (vesículas) de la invención

- 15 La fabricación de preparaciones de vesículas de cualquiera de las cepas modificadas mencionadas, se puede lograr recogiendo las vesículas liberadas de forma natural por las bacterias, o por cualquiera de los procedimientos conocidos para el experto en la materia (p. ej., como se describe en los documentos EP 301992, US 5.597.572, EP 11243 o US 4.271.147).

- 20 Una preparación de vesículas de membrana obtenida de la bacteria de la invención, es un aspecto adicional de esta invención. Preferiblemente, la preparación de las vesículas de membrana se puede filtrar a través de una membrana de 0,22 μm .

- 25 También está prevista una preparación estéril (preparada homogéneamente) de vesículas de membrana que se puede obtener haciendo pasar las vesículas de membrana de la bacteria de la invención a través de una membrana de 0,22 μm .

Formulaciones de vacuna

- 30 Un aspecto adicional de la invención es una vacuna que comprende una bacteria de la invención o una preparación de vesículas de la invención junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas vacunas se usan de forma ventajosa en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal.

- 35 La preparación de vacuna se describe en general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York).

- 40 Las preparaciones de vacunas de la presente invención pueden llevar adyuvantes. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio (en particular carbonato de calcio), hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente, o polifosfazenos.

- 45 Los sistemas adyuvantes Th1 adecuados que se pueden usar incluyen monofosforil-lípido A, en particular monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado, y una combinación de monofosforil-lípido A, preferiblemente monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), junto con una sal de aluminio. Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil-lípido A y un derivado de saponina, en particular, 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 se atenúa con colesterol como se describe en el documento WO96/33739. Una formulación adyuvante 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.

- 50 La vacuna puede comprender una saponina, preferiblemente QS21, También puede comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Los oligonucleótidos que contienen CpG no metilada (documento WO 96/02555) también son inductores preferidos de una respuesta TH1 y son adecuados para usar en la presente invención.

- 55 La preparación de vacuna de la presente invención se puede usar para proteger o tratar un mamífero susceptible de infección, mediante la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o administración por vía mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es un procedimiento de protección de un individuo frente a una infección bacteriana, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz (capaz de inmunoproteger a un individuo frente a la bacteria fuente) de una bacteria de la invención o una preparación de vesículas de la invención.

- 60 La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona de una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos, de las vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico que se use y de cómo se presenta. En general, se espera que cada dosis comprenda 1-100 μg de antígeno proteínico, preferiblemente 5-50 μg y los más habitualmente en el intervalo de 5-25 μg .

Una cantidad óptima para una vacuna particular se puede calcular mediante estudios estándar que implican la observación de las respuestas inmunitarias adecuadas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas de forma adecuada.

5 También se contempla un procedimiento de preparación de una composición de vacuna que comprende una preparación de vesículas de membrana de la invención, cuyo procedimiento comprende: (a) inocular un recipiente de cultivo que contiene un medio nutriente adecuado para el crecimiento de la bacteria de la invención; (b) cultivar dicha bacteria; (c) recuperar las vesículas de membrana del medio; y (d) mezclar dichas vesículas de membrana con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las vesículas se pueden recuperar por extracción con detergente (p. ej., desoxicolato), pero preferiblemente se recuperan sin dicha etapa (y las etapas de cromatografía y ultracentrifugación necesarias que van con la misma).

15 Preferiblemente después de la etapa (c) o etapa (d), la preparación se esteriliza por filtración (a través de una membrana de 0,22 μm).

20 También se proporciona un procedimiento para producir una bacteria formadora de hipervesículas de la invención, cuyo procedimiento comprenden modificar genéticamente una cepa bacteriana Gram negativa por uno o ambos de los siguientes procedimientos: (a) diseño de la cepa para reducir la expresión de uno o más genes *Tol*; y (b) mutación de uno o más genes que codifican una proteína que comprende un sitio asociado a péptidoglucanos para atenuar la actividad de unión a péptidoglucanos de la o las proteínas.

Secuencias de nucleótidos de la invención

25 Un aspecto adicional de la invención se refiere a proporcionar las secuencias de nucleótidos (véase las listas de secuencias adjuntas) que se pueden usar en los procedimientos (reducción de expresión/mutación) de la invención.

30 Otro aspecto de la invención es una secuencia de polinucleótido aislada que hibrida en condiciones de restricción alta con al menos una parte de 30 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos de la invención (p. ej., SEQ ID NO: 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 ó 44) o una cadena complementaria de la misma. Preferiblemente, la secuencia aislada será suficientemente larga para realizar la recombinación homóloga con la secuencia cromosómica si es parte de un vector adecuado, en particular al menos 30 nucleótidos (preferiblemente, al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 ó 500 nucleótidos). Más preferiblemente, el polinucleótido aislado debe comprender al menos 30 nucleótidos (preferiblemente al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 ó 500 nucleótidos) de las secuencias reales proporcionadas o una cadena complementaria de las mismas.

35 Tal como se usa en el presente documento, las condiciones de hibridación de restricción alta incluyen, por ejemplo, 6X SSC, 5X disolución de Denhardt, SDS al 0,5% y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, hibridado durante una noche a 65°C y lavado en 2X SSC, SDS al 0,1% una vez a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos, seguido de una vez a 65°C durante aproximadamente 15 minutos, seguido de al menos un lavado en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante al menos 3-5 minutos.

40 Un aspecto adicional es el uso de secuencias de polinucleótidos aisladas de la invención para llevar a cabo un suceso de ingeniería genética (tal como inserción de transposón, o mutación o delección específica de sitio, pero preferiblemente un suceso de recombinación homóloga) en un gen de cromosoma de bacteria Gram negativa con el fin de reducir la expresión o mutarla como se ha descrito antes. Preferiblemente, la cepa en la que tiene lugar el suceso de recombinación, es la misma que la cepa de la que se obtienen las secuencias de la invención. Sin embargo, los genomas de meningococos A, B, C, Y y W y genococos son suficientemente similares, de modo que la secuencia de cualquiera de estas cepas puede ser adecuada para diseñar vectores para realizar dichos sucesos en las otras cepas. Es probable que este sea el caso también para *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus influenzae* no tipificable.

50

Ejemplos

55 Los siguientes ejemplos se llevan a cabo usando técnicas estándar que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia, salvo cuando se describen en detalle. Los ejemplos son ilustrativos y no limitan la invención.

Ejemplo 1

60 *Construcción de una cepa de Neisseria meningitidis que carece del gen RmpM funcional*

65 El objetivo del experimento era construir una cepa de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B que expresara una proteína Rmp truncada. Rmp de *Neisseria meningitidis* es homóloga a OmpA de *E. coli* y OprF de *P. aeruginosa*. Esta proteína contiene un dominio N-terminal anclado en la membrana externa y un dominio C-terminal que contiene un sitio asociado a péptidoglucanos. El dominio C-terminal de Rmp se eliminó por recombinación homóloga en una cepa *cps-* de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B. La parte N-terminal de la proteína expresada todavía tendrá su función en la estabilidad de la membrana externa, mientras que la ausencia del sitio asociado a péptidoglucanos relajará la membrana alrededor de la bacteria. Se analizaron las vesículas de la membrana externa de esta *Neisseria* modificada:

cantidad de producción, tamaño, homogeneidad. Se descubrió una región de ADN (729 pb) correspondiente al gen *rmp* (SEQ ID N° 9) en la base de datos Sanger que contenía secuencias de ADN genómico de la cepa de *Neisseria meningitidis* serogrupo A Z2491. Hay una secuencia similar presente en la cepa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B MC58 (SEQID N° 7); presenta 99,3% de identidad con la secuencia de *menA*. Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que cubría la secuencia completa del gen del ADN genómico de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, usando los oligonucleótidos **RMP-H-5** (5'- GCC CAC AAG CTT ATG ACC AAA CAG CTG AAA TT-3') y **RMP-E-3** (5'- CCG GAA TTCTTAGTGTGGTG ATG ATTGT-3') que contienen los sitios de restricción *HindIII* y *EcoRI* (subrayados). Este fragmento de la PCR se limpió con el kit High Pure (Roche, Mannheim, Alemania) y se clonó directamente en un vector pGemT (Promega, EE.UU.). Este plásmido se sometió a mutagénesis por PCR circular (Jones y Winistofer (1992), *Biotechniques* 12: 528-534) con el fin de introducir una delección de 33 pb y un codón de parada después del resto de fenilalanina interior. La PCR circular se llevó a cabo usando los oligonucleótidos **PW-CIRC-3-B** (5'-GGC GGA TCC TTA GAA CAG GGT TTT GGC AG-3') y **RMP CIRC-5-B** (5'-CGG GGA TCC CAA GAC AAC CTG AAA GTA TT-3') que contienen sitios de restricción *BamHI* (subrayados). El gen *cmR* se amplificó en el plásmido pGPS2, con los oligonucleótidos **CM/BAM/5/2** (5'-CGC GGA TCC GCC GTC TGA AAC CTG TGA CGG AAG ATC AC-3') y **CM/BAM/3/2** (5'-CGC GGA TCC TTC AGA CGG CCC AGG CGT TTA AGG GCA C-3') que contienen secuencias de absorción y sitios de restricción *BamHI* (subrayados). Este fragmento se insertó en el plásmido circular de la PCR tratado con la enzima de restricción *BamHI*. El plásmido recombinante se usó para transformar la cepa *cps*- de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. La *Neisseria meningitidis* recombinante resultante de un suceso de sobrecruzamiento doble se seleccionó por cribado por PCR con los cebadores **RMP SCR 5** (5'- CAT GAT AGA CTA TCA GGA AAC-3') y **RMP SCR 3** (5'-CAG TAC CTG GTACAAAATCC-3'). Estos cebadores amplifican un fragmento de 970 bp a partir de la cepa de control (WT para *rmp*) y uno de 1800 pb de una *Neisseria* recombinante. La figura 4 muestra las amplificaciones por PCR obtenidas de 10 colonias recombinantes analizadas en un gel de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio. Los recombinantes se hicieron crecer en medio GC que contenía cloranfenicol 5 µg/ml y se analizó la expresión de Rmp y la producción de OMV.

Caracterización de OMV de *menB* producidas de un mutante *rmpM*

Se analizó el efecto de la mutación *rmpM* en el rendimiento de OMV, tamaño y polidispersión, comparando las OMV extraídas (usando desoxicolato) de H44/76 Cps- (polisacárido no capsular) y las correspondientes OMV extraídas del derivado mutante RmpM. Los resultados son los siguientes:

Rendimientos de OMV observados con diferentes cepas derivadas de *N. meningitidis* H44/76 hechas crecer en matraces de cultivo de 400 ml

Cepa Nm B1390 cps(-) *porA*(+) PilQ atg: 2,7 mg

Cepa Nm B1391 cps(-) *porA*(-) PilQ atg: 9,1 mg

Cepa B1405 cps(-) *porA*(-) RmpM (-): 20 mg

Como se muestra a continuación, la delección de *rmpM* aumenta significativamente (al menos en un factor 2) el rendimiento de las OMV preparadas a partir de dicha cepa. El tamaño de las OMV aisladas de cepas derivadas de *N. meningitidis* H44/46 mutantes *rmpM* y salvajes, se calculó por espectroscopía de correlación de fotones (PCS) usando el analizador Malvern Zetasizer 4000 recomendado por el proveedor (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg Germany: www.malvern.co.uk). Los resultados se resumen a continuación:

Muestras	Diámetro medio Z (nm)	Polidispersidad
CPS (-) 07/2000 7,8 mg/ml	136	0,31
CPS (-) 09/2000 5,7 mg/ml	166	0,42
CPS (-) <i>rmpM</i> (-) B1405 6,7 mg/ml	202	0,53

Estos datos apoyan que el tamaño de CPS (-) 07/2000 es menor que el tamaño de CPS (-) 09/2000 y también que el tamaño de las muestras de CPS (-) es menor que el tamaño de las vesículas de CPS (-)*rmpM*(-). Estos datos juntos apoyan que la delección de un dominio que codifica el dominio asociado a péptidoglucanos de RmpM conduce a una formación potenciada de vesículas y morfología y distribución de tamaño de las OMV alteradas. Estas características se podían usar ventajosamente para producir vacunas como se publica en el documento WO 01/09350 (publicado por WIPO el 8/2/01 e incorporado en el presente documento por referencia).

Ejemplo 2

Deleción de los genes *tolQR* en *Moraxella catarrhalis*

- 5 El objetivo del experimento era eliminar los genes *tolQR* de *Moraxella catarrhalis* con el fin de obtener una cepa de *Moraxella* formadora de hiperburbujas.

Para este propósito, se construyó un plásmido mutador usando tecnologías de clonación de *E. coli*. Las etapas principales se muestran en la figura 5. Brevemente, se extrajo el ADN genómico de la cepa de *Moraxella catarrhalis* ATCC 43617 utilizando el kit de extracción de ADN genómico de QIAGEN (Qiagen GmbH). Este material se usó para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ADN de 2151 nucleótidos que cubría 501 nucleótidos secuencia arriba del codón de inicio del gen *tolQ* (ATG) hasta 500 nucleótidos secuencia abajo del codón de parada *tolR* (TAA) usando los cebadores A (5' - GCTCTAGAGCTTCAGCAGTCACG-GGCAAATCATGATTA - 3') y B (5' - CGGAGCTCTGCTCAAGGTCTGAGACATGATTAGAATAT - 3'). Este producto de la PCR se introdujo en el vector de clonación pGEM-T (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido obtenido después se sometió a mutagénesis por PCR circular (Jones y Winistofer, (1992), *Biotechniques* 12: 528-534) con el fin de suprimir los genes *tol QR* (que consiste en la amplificación del vector entero sin la región comprendida entre los dos cebadores). La PCR circular se llevó a cabo usando los cebadores C (5' - CGGGATCCAGCGAGATT-AGGCTAATGGATTTCGTTCA - 3') y D (5' - CGGGATCCAATGTTGGTATCACCCAAGTGAGTTTGCTT - 3') que hibridan con 31 nucleótidos secuencia abajo del codón de inicio (ATG) de *tolQ* y 48 pb secuencia arriba del codón de parada (TAA) de *tolR*, respectivamente (véase la Figura 5). Ambos cebadores contienen un sitio de restricción *Bam*HI (subrayado). El fragmento de la PCR obtenido después se purificó usando el kit PCR Clean Up (Boehringer), se hizo digerir con *Bam*HI y se ligó, dando como resultado un plásmido que llevaba una secuencia 5'-flanqueadora de 532 nucleótidos y una secuencia 3'-flanqueadora de 548 nucleótidos separadas por un sitio de restricción *Bam*HI. Después se introdujeron casetes de resistencia a la kanamicina en el sitio *Bam*HI con el fin de poder seleccionar recombinantes en las bacterias huésped. Se subclonaron dos casetes diferentes dando dos plásmidos diferentes; uno era el gen de resistencia a la kanamicina Tn903 (KanR) subclonado en el plásmido pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech) y el otro era un casete *sacB-neo* que procede de pIB279 que llevaba el gen de resistencia a la kanamicina de Tn5 y el gen *sacB* gene (Blomfield y col., (1991), *Molecular Microbiology*, 5: 1447-1457). *sacB* es un marcador de contraselección perjudicial para bacterias en presencia de sacarosa y permite sacar más el casete. Ambos casetes se subclonaron usando los sitios de restricción *Bam*HI disponibles. Las secuencias de los clones obtenidos se han confirmado usando el kit de secuenciación Big Dye Cycle (Perkin Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM. Alternativamente, se puede usar el vector suicida pKNG101 para introducir la mutación después de subclonar las regiones flanqueadoras en el sitio de multiclonación del vector (Kaniga y col., (1991), *Gene* 109:137-141).

Se usó el plásmido que lleva el marcador de resistencia de la kanamicina de Tn903 para transformar la cepa de *Moraxella catarrhalis* 14 aislada de nasofaringe humana en Oslo, Noruega. La técnica de transformación se basa en la competencia de absorción de ADN natural de la cepa. Se mezclaron ~10 colonias de bacterias con 25 µg de ADN (en 20 µl de PBS) y se incubaron durante 3 horas a 36°C. Se seleccionaron los clones recombinantes de *Moraxella catarrhalis* en placas Muller-Hinton que contenían kanamicina 20 µg/ml y se cribaron por PCR los mutantes resultantes de un suceso recombinante doble, usando los cebadores E (5'-ATCGGCGTGGCTGTGTGTGGC - 3'), F (5'-ACCGAATTGGATTGAGGTCAC - 3'), G (5'- GCGATTTCAGGCCTGGTATGAG - 3') y H (5'- TTGTGCAATGTAACATCAGAG - 3'). Después de amplificación térmica, se analizó una parte alícuota de ~10 µl de la reacción por electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 1% en un tampón de Tris-borato-EDTA (TBE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron por iluminación UV después de electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Se realizó la electroforesis de un patrón de tamaño molecular de ADN (Smartladder, Eurogentec) en paralelo con las muestras de ensayo y se usó para calcular el tamaño de los productos de la PCR. Como se muestra en la figura 6, varios transformantes produjeron el producto de la PCR del tamaño esperado y se identificaron como cepas mutantes de *Moraxella catarrhalis tolQR*. La secuenciación confirmó la integración correcta del casete. Se ensayó en estos clones la producción de vesículas de la membrana externa.

Ejemplo 3

Mutación de *ompCD* de *Moraxella catarrhalis*

- El objetivo del experimento era mutar el gen *ompCD* de *Moraxella catarrhalis* en un gen truncado sin la región codificante 3' asociada a péptidoglucanos, con el fin de obtener una cepa de *Moraxella* formadora de hipervesículas. En este experimento se introdujo un codón de parada después de la fenilalanina al final del dominio de transmembrana de la proteína.

Para este propósito, se construyó un plásmido mutador usando las tecnologías de clonación de *E. coli*. Las etapas principales se muestran en la figura 7. Brevemente, el ADN genómico se extrajo de la cepa de *Moraxella catarrhalis* ATCC 43617 usando el kit de extracción de ADN genómico QIAGEN (Qiagen GmbH). Este material se usó para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ADN de 1000 nucleótidos que cubría 500 nucleótidos secuencia arriba y secuencia abajo del resto de fenilalanina crítico, usando los cebadores 1 (5' - CCTCTAGACGCTTATTATAACATAAATCAGTCTAACTG - 3') y 2 (5' - AAGGTACCAG-CA

GAAGTAGGCAATGGGCAAAACATTGC - 3'). Este producto de la PCR se introdujo en el vector de clonación pGEM-T (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después el plásmido obtenido se sometió a mutagénesis por PCR circular (Jones y Winistofer, (1992), *Biotechniques* 12: 528-534) con el fin de introducir un codón de parada y un sitio de restricción *Bam*HI. La PCR circular se llevó a cabo usando los cebadores (5' - CCGGATCCTTAACGGTATTGTGGTTTGATGATTGATT - 3') y 4 (5' - AAGGATCCGCGCAAATGCGTGAATT CCCAAATGCAACT - 3') que hibridaban con 62 nucleótidos secuencia arriba y 39 nucleótidos secuencia abajo del codón TTC que codifica la fenilalanina (Figura 7). Ambos cebadores contienen un sitio de restricción *Bam*HI (subrayado) y el cebador 3 también contiene el codón de parada (negrilla). Después el fragmento de la PCR obtenido se purificó usando el kit PCR Clean Up (Boehringer), se hizo digerir con *Bam*HI y se ligó, dando como resultado un plásmido que llevaba una secuencia 5'-flanqueadora de 438 nucleótidos y una secuencia 3'-flanqueadora de 540 nucleótidos separadas por un sitio de restricción *Bam*HI. Después se introdujeron casetes de resistencia a la kanamicina en el sitio *Bam*HI con el fin de poder seleccionar recombinantes en las bacterias huésped. Se subclonaron dos casetes diferentes dando dos plásmidos diferentes, uno era el gen de resistencia a la kanamicina de TN903 (KanR) subclonado en el plásmido pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech) y el otro era un casete *SacB*-neo que procede de pIB179 que lleva el gen de resistencia a la kanamicina de Tn5 y el gen *sacB* (Blomfield y col., (1991), *Molecular Microbiology*, 5:1447-1457). *sacB* es un marcador de contraselección perjudicial para las bacterias en presencia de sacarosa y permite sacar más el casete. Ambos casetes se subclonaron usando los sitios de restricción *Bam*HI disponibles. Las secuencias de los clones obtenidos se confirmaron usando el kit de secuenciación Big Dye (Perkin Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM. Alternativamente, se puede usar el vector suicida pKNG101 para introducir la mutación después de subclonar las regiones flanqueadoras en el sitio de multiclonación del vector (Kaniga y col., (1991), *Gene* 109: 137-141).

El plásmido que lleva el marcador de resistencia a la kanamicina de Tn903 se puede usar para transformar *Moraxella catarrhalis*. Los clones recombinantes de *Moraxella catarrhalis* se pueden seleccionar en placas Muller-Hinton que contienen kanamicina 20 µg/ml y se pueden seleccionar los mutantes que resultan de un suceso recombinante doble por PCR. Después se puede ensayar en estos clones la producción de vesículas de la membrana externa.

30 Ejemplo 4

Deleción de los genes tolQR en Haemophilus influenzae no tipificable

El objetivo del experimento era eliminar los genes *tolQR* *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHI) con el fin de obtener una cepa formadora de hiperburbujas.

Para este propósito, se construyó un plásmido mutador usando tecnologías de clonación de *E. coli*. Las etapas principales se muestran en la figura 5. Brevemente, se extrajo el ADN genómico de la cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable 3224A utilizando el kit de extracción de ADN genómico de QIAGEN (Qiagen GmbH). Este material se usó para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ADN de 1746 nucleótidos que cubría 206 nucleótidos secuencia arriba del codón del gen *tolQ* hasta 364 nucleótidos secuencia abajo del codón de parada *tolR* usando los cebadores ZR1-EcoRI (5' - CCGGAATTCAAAGTGCGGTAGATTTAGTCG TAGTAATTGATTACTTATG - 3') y ZR2-XbaI (5' - CTAGTCTAGAACGTTGCTGTTCTTGCTG - 3'). Este producto de la PCR se introdujo en el vector de clonación pGEM-T (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido obtenido se sometió a mutagénesis por PCR circular (Jones y Winistofer, (1992), *Biotechniques* 12: 528-534) con el fin de suprimir los genes *tol QR* (que consiste en una amplificación del vector entero sin la región comprendida entre los dos cebadores). La PCR circular se llevó a cabo usando los cebadores ZR1-BamHI (5' - CGCGGATCCCGCTTCAGGTGCATCTGG - 3') y ZR2-BamHI (5' - CGCGGATCCAGACAGGAATTTGATAAGG - 3') que hibridan con 312 nucleótidos secuencia abajo del codón de inicio de *tolQ* y 144 pb secuencia arriba del codón de parada de *tolR*, respectivamente (Figura 5). Ambos cebadores contienen un sitio de restricción *Bam*HI (subrayado). El fragmento de la PCR obtenido después se purificó usando el kit PCR Clean Up (Boehringer), se hizo digerir con *Bam*HI y se ligó, dando como resultado un plásmido que llevaba una secuencia 5'-flanqueadora de 517 nucleótidos y una secuencia 3'-flanqueadora de 507 nucleótidos separadas por un sitio de restricción *Bam*HI. Después se introdujeron casetes de resistencia a la kanamicina en el sitio *Bam*HI con el fin de poder seleccionar recombinantes en las bacterias huésped. Se subclonaron dos casetes diferentes dando dos plásmidos diferentes, uno era el gen de resistencia a la kanamicina Tn903 (KanR) subclonado en el plásmido pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech) y el otro era un casete *sacB*-neo procedente de pIB279 que llevaba el gen de resistencia a la kanamicina de Tn5 y el gen *sacB* (Blomfield y col., (1991), *Molecular Microbiology*, 5: 1447-1457). *sacB* es un marcador de contraselección perjudicial para bacterias en presencia de sacarosa y permite sacar más el casete. Ambos casetes se subclonaron usando los sitios de restricción *Bam*HI disponibles. Las secuencias de los clones obtenidos se han confirmado usando el kit de secuenciación Big Dye Cycle (Perkin Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM. Alternativamente, se puede usar el vector suicida pKNG101 para introducir la mutación después de subclonar las regiones flanqueadoras en el sitio de multiclonación del vector (Kaniga y col., (1991), *Gene* 109:137-141).

Se usó el plásmido que lleva el marcador de resistencia a la kanamicina de Tn903 para transformar la cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable 3224A. La transformación se realizó usando células NTHI competentes obtenidas por un tratamiento con cloruro de calcio de acuerdo con "Methods in Enzymology, Bacterial genetic systems", ed. J.

H. Miller, Academic Press Inc., vol. 204, p. 334. Los clones de *Haemophilus influenzae* no tipificable se seleccionaron en placas GC que contenían kanamicina 15 µg/ml y los mutantes resultantes de un suceso recombinante doble se cribaron por PCR usando los cebadores NTHI-Fo-ZR1 (5' - CCTTACTAGAGGAACAACAACCTC - 3'), NTHI-RE-ZR2 (5' - GCCTCTTCAGCTTGCTTCTG - 3'), ZR1-EcoRI (5' - CCGGAATTCAAAGTGCGGTAGATTAGTCG
 5 TAGTAATTGATTACTTATG - 3') y ZR2-XbaI (5' -CTAGTCTAGAACGTTGCTGTTCTTGCTG - 3'). Después de amplificación térmica, se analizó una parte alícuota de ~10 µl de la reacción por electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 1% en un tampón de Tris-borato-EDTA (TBE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron por iluminación UV después de electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Se realizó la electroforesis de un patrón de tamaño molecular de ADN (Smartladder, Eurogentec) en paralelo con las muestras de ensayo y se usó para calcular el
 10 tamaño de los productos de la PCR. Varios transformantes produjeron el producto de la PCR del tamaño esperado y se identificaron como cepas mutantes de *Haemophilus influenzae* no tipificable que llevan el casete de resistencia al antibiótico.

15 Ejemplo 5

Deleción de los genes tolRA en Haemophilus influenzae no tipificable

El objetivo del experimento era eliminar los genes *tolRA* *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHI) con el fin
 20 de obtener una cepa formadora de hiperburbujas.

Para este propósito, se construyó un plásmido mutador usando tecnologías de clonación de *E. coli*. Las etapas principales se muestran en la figura 5. Brevemente, se extrajo el ADN genómico de la cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable 3224A utilizando el kit de extracción de ADN genómico de QIAGEN (Qiagen GmbH). Este material
 25 se usó para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ADN de 1797 nucleótidos que cubría 244 nucleótidos secuencia arriba del codón del gen *tolR* hasta el codón de parada de *tolA* usando los cebadores ZR5-EcoRI (5' -CCGGAATTCAAAGTGCGGTAGATTAGTCGTAATTCGCTGAGGCC - 3') y ZR6-XbaI (5' - CTAGTCTAGATTATCGAATATCAAAGTCAATAATG - 3'). Este producto de la PCR se introdujo en el vector de clonación pGEM-T (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido obtenido se sometió a
 30 mutagénesis por PCR circular (Jones y Winistofer, (1992), *Biotechniques* 12: 528-534) con el fin de suprimir los genes *tolRA* (que consiste en una amplificación del vector entero sin la región comprendida entre los dos cebadores). La PCR circular se llevó a cabo usando los cebadores ZR5-BamHI (5' - CGCGGATCCTTCTTCTGTTTAAACCTTCTTG - 3') y ZR6-BamHI (5' - CGCGGATCCAAGCAAAGGCTGAAGCGG - 3') que hibridan con 527 nucleótidos secuencia abajo del codón de inicio de *tolR* y 500 nucleótidos secuencia arriba del codón de parada de *tolA*, respectivamente
 35 (Figura 5). Ambos cebadores contienen un sitio de restricción *Bam*HI (subrayado). El fragmento de la PCR obtenido después se purificó usando el kit PCR Clean Up (Boehringer), se hizo digerir con *Bam*HI y se ligó, dando como resultado un plásmido que llevaba una secuencia 5'-flanqueadora de 502 nucleótidos y una secuencia 3'-flanqueadora de 500 nucleótidos separadas por un sitio de restricción *Bam*HI. Después se introdujeron casetes de resistencia a la kanamicina en el sitio *Bam*HI con el fin de poder seleccionar recombinantes en las bacterias huésped. Se subclonaron
 40 dos casetes diferentes dando dos plásmidos diferentes, uno era el gen de resistencia a la kanamicina de Tn903 (KanR) subclonado en el plásmido pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech) y el otro era un casete *sacB-neo* procedente de pIB279 que llevaba el gen de resistencia a la kanamicina de Tn5 y el gen *sacB* (Blomfield y col., (1991), *Molecular Microbiology*, 5: 1447-1457). *sacB* es un marcador de contraselección perjudicial para bacterias en presencia de sacarosa y permite sacar más el casete. Ambos casetes se subclonaron usando los sitios de restricción *Bam*HI disponibles. Las secuencias de los clones obtenidos se han confirmado usando el kit de secuenciación Big Dye Cycle (Perkin Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM. Alternativamente, se puede usar el vector suicida pKNG101 para introducir la mutación después de subclonar las regiones flanqueadoras en el sitio de multiclonación del vector
 45 (Kaniga y col., (1991), *Gene* 109:137-141).

Se usó el plásmido que lleva el marcador de resistencia a la kanamicina de Tn903 para transformar la cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable 3224. La transformación se realizó usando células NTHI competentes obtenidas por un tratamiento con cloruro de calcio de acuerdo con "Methods in Enzymology, Bacterial genetic systems", ed. J. H. Miller, Academic Press Inc., vol. 204, p. 334. Los clones recombinantes de *Haemophilus influenzae* no tipificable se seleccionaron en placas GC que contenían kanamicina 15 µg/ml y los mutantes resultantes de un suceso recombinante doble
 55 se cribaron por PCR usando los cebadores NTHI-FO-ZR5 (5' - CGCTGAGGCCTTGATTGC - 3'), NTHI-RE-ZR6 (5' - GTACAATCGCGAATACGCTCAC - 3'), ZR5-EcoRI (5' -CCGGAATTCAAAGTGCGGTAGATTAGTCGTAATTCGCTGAGGCC - 3') y ZR6-XbaI (5' - CTAGTCTAGATTATC-GAATATCAAAGTCAATAATG - 3'). Después de amplificación térmica, se analizó una parte alícuota de ~10 µl de la reacción por electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 1% en un tampón de Tris-borato-EDTA (TBE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron por iluminación UV después de electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Se realizó la electroforesis de un patrón de tamaño molecular de ADN (Smartladder, Eurogentec) en paralelo con las muestras de ensayo y se usó para calcular el tamaño de los productos de la PCR. Varios transformantes produjeron el producto de la PCR del tamaño esperado y se identificaron como cepas mutantes de *Haemophilus influenzae* no tipificable que llevan el casete de resistencia al
 60 antibiótico.

65

Ejemplo 6

Mutación del gen P5 en Haemophilus influenzae no tipificable

- 5 El objetivo del experimento era mutar el gen P5 de *Haemophilus influenzae* (NTHI) en un gen truncado sin la región codificante 3' asociada a péptidoglucanos, con el fin de obtener una cepa de NTHI formadora de hipervesículas. En este experimento se introdujo un codón de parada después de la fenilalanina al final del dominio de transmembrana de la proteína.
- 10 Para este propósito, se construyó un plásmido mutador usando las tecnologías de clonación de *E. coli*. Las etapas principales se muestran en la figura 7. Brevemente, el ADN genómico se extrajo de la cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable 3224A usando el kit de extracción de ADN genómico QIAGEN (Qiagen GmbH). Este material se usó para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ADN de 1047 nucleótidos
- 15 secuencia arriba y secuencia abajo del codón TTT que codifica el resto de fenilalanina crítico, usando los cebadores P5-01 bis (5'-GATGAATTCAAAGTGCGGTAGATTTAGTCGTAGTAAT-TAATAACTTA - 3') y P5-02 (5' - CTAGTCTAGAAGGTTTCCATAATGTTTCCTA - 3'). Este producto de la PCR se introdujo en el vector de clonación pGEM-T (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después el plásmido obtenido se sometió a mutagénesis por PCR circular (Jones y Winistofer, (1992), *Biotechniques* 12: 528-534) con el fin de introducir un codón de parada y un sitio de restricción *Bam*HI. La PCR circular se llevó a cabo usando los cebadores (5' - CGCG-
- 20 GATCCCTAAAAAGTTACATCAGAATTAAAGC - 3') y P5-04 (5' - CGCGGATCCGCATTTGGTAAAGCAAACCTT - 3') que hibridan exactamente con el codón TTT que codifica la fenilalanina (Figura 7). Ambos cebadores contienen un sitio de restricción *Bam*HI (subrayado) y el cebador 3 también contiene también el codón de parada (negrilla). Después el fragmento de la PCR obtenido se purificó usando el kit PCR Clean Up (Boehringer), se hizo digerir con *Bam*HI y se ligó, dando como resultado un plásmido que llevaba una secuencia 5'-flanqueadora de 518 nucleótidos y
- 25 una secuencia 3'-flanqueadora de 538 nucleótidos separadas por un sitio de restricción *Bam*HI. Después se introdujeron casetes de resistencia a la kanamicina en el sitio *Bam*HI con el fin de poder seleccionar recombinantes en las bacterias huésped. Se subclonaron dos casetes diferentes dando dos plásmidos diferentes, uno era el gen de resistencia a la kanamicina de TN903 (KanR) subclonado en el plásmido pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech) y el otro era un casete *SacB*-neo procedente de pIB179 que lleva el gen de resistencia a la kanamicina de Tn5 y el gen *sacB* (Blomfield
- 30 y col., (1991), *Molecular Microbiology*, 5:1447-1457). *sacB* es un marcador de contraselección perjudicial para las bacterias en presencia de sacarosa y permite sacar más el casete. Ambos casetes se subclonaron usando los sitios de restricción *Bam*HI disponibles. Las secuencias de los clones obtenidos se confirmaron usando el kit de secuenciación Big Dye Cycle (Perkin Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM. Alternativamente, se puede usar el vector suicida pKNG101 para introducir la mutación después de subclonar las regiones flanqueadoras en el sitio de
- 35 multiclonación del vector (Kaniga y col., (1991), *Gene* 109: 137-141).

- Se usó el plásmido que lleva el marcador de resistencia a la kanamicina de Tn903 para transformar la cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable 3224. La transformación se realizó usando células NTHI competentes obtenidas por un tratamiento con cloruro de calcio de acuerdo con "Methods in Enzymology, Bacterial genetic systems", ed. J. H.
- 40 Miller, Academic Press Inc., vol. 204, p. 334. Los clones recombinantes de *Haemophilus influenzae* no tipificable se seleccionaron en placas GC que contenían kanamicina 15 µg/ml y los mutantes resultantes de un suceso recombinante doble se cribaron por PCR usando los cebadores P5-01 bis (5'-GATGAATTCAAAGTGCGGTAGATTTAGTCGTAGTAATAATAACTTA - 3') y P5-02 (5' - CTAGTCTAGAAGGTTTCCATAATGTTTCCTA - 3'). Después de amplificación térmica, se analizó una parte alícuota de ~10 µl de la reacción por electroforesis en gel de agarosa (agarosa al
- 45 1% en un tampón de Tris-borato-EDTA (TBE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron por iluminación UV después de electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Se realizó la electroforesis de un patrón de tamaño molecular de ADN (Smartladder, Eurogentec) en paralelo con las muestras de ensayo y se usó para calcular el tamaño de los productos de la PCR. Varios transformantes produjeron el producto de la PCR del tamaño esperado y se identificaron como cepas mutantes de *Haemophilus influenzae* no tipificable que llevan el casete de resistencia al antibiótico.

50 SEQ. ID NO: 1

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de *exbB* de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

55 N° de acceso y secuencias (ADN y proteína) de la cepa de NmB ExbB

```
>NMB1729
ATGAATTGAAATTAGTGTGTTGAATCGGGCGATCCCGTCTGATTGGTGTGTTGTGTTG
ATGCTGTGATGAGTATCGTAACGTGGTGTGTTGGTGTGTTGCGCTGCATCAAGCTGTAT
CGGGCGCGCAAAGGGAATGCGCGCTCAAACGGCATATGCGGATACTTTGTGCTGAAC
GACGCGGTGCAAAAAGTGCGCGCGTTCGATGCGCCTTTGTCCAACTGGCGCAAGAGGCA
TTGCAGTCTTACCGCAACTACCGCGAAACGAAGCGTCCGAAGTGGCGCAGGCTTTGCCG
TTGAACGAGTATTGGTCATTCAAATCCGCAACAGTATGGCGCAGATTATGCGCCGGTTT
GATTACGGGATGACCGCGCTTGCTCCATCGGCGCGACCGCGCGCTTATCGGGCTGTC
GGCAGGTTTGGGGGATTACCAAGCCCTGATCAATATCGGGCAAAGCGGGCAGATGAGT
ATTGCGGCGGTTGCGCGCCGATTGGCGAGGCACTGGTGGCGACGGCGGGGTTTGTTC
GTGGCGATTCCGCGGTGTTGGCATACTTCTCTCAATCGCGGCACAAAATACTGACC
CAGGATTGGATGCGATGGCGCAGATTGTCACGTCGCGCTGCTTAATCAAAGGATAGC
```

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 2

Secuencia de aminoácidos de ExbB de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

```

5      >NMB1729
      MNLKLVFESGDPVLIGVFLMLLMSIVTWCLVVLRCIKLYRARKGNAAVKRHRDRTLIN
      DAVEKVRVADAPLSKLAQELQSYRNYRRNEASELAQALPLNEYLVLIQIRNSMAQIMRRF
      DYGMTALASIGATAPFFIGLFGTVWGIYHALINIGQSGQMSIAAVAGPIGEALVATAAGLF
      VAI PAVLAYNFLNRGTKIILTQDLDAHADLHVRLLNQKDS
10

```

SEQ. ID NO: 3

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de exbD de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

Nº de acceso y secuencias (ADN y proteína) de la cepa NmB de ExbD

```

20      >NMB1728
      ATGGCATTGGTTCGATGAATTCCGGCGACGATTCTCCGATGTCCGACATCAACGTTACG
      CCGTTGGTGGACGTGATGCTGGTGTGCTGATTGTGTTTATGATTACTATGCCGGTGCTG
      ACGCATTCCATCCCTTTGGAAGTCCCGACCGCGTCCGAGCAGACAAACAAGCAGGACAAA
      CAGCCTAAAGACCCCTGCGCTGACGATTGATGCGAACGGCGGCTATTATGTGCGCGGG
      GATTCTGCAAGCAAAGTGGAAATCGGGGAAGTGGAAAGCCGTCTGAAAGCCGCCAAGGAG
25      CAGAATGAAACGTGATTGTGGCGATTGCGGCAGACAAGGCGGTGGAATACGATTATGTA
      AACAAAGCTTTAGAAGCCGCCCGTCAGGCAGGAATCACCAAAATCGGTTTGTAAACCGAA
      ACCAAGGCGCAA

```

SEQ. ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos de ExbD de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

```

35      >NMB1728
      MAPGSMNSGDDSPMSDINVTPLVDVMLVLLIVFMITMPVLTHSIPLELPTASEQTNKQDK
      QPKDPLRLTIDANGGYVGGDSASKVEIGEVESRLKAAKEQNEENVIVALAADKAVEYDYV
      NKALEAARQAGITKIGFVTETKAQ
40

```

SEQ. ID NO: 5

Secuencia de nucleótidos de la región de ADN (1000 pb) secuencia arriba del gen exbB de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

Secuencia de ADN de 1 kb secuencia arriba de ExbB de la cepa MC58 de NmB

```

50      5' -CATAATGATTCCAACACTGAAAAACCAATCAAACATCCAAGCTGCCGCAAACCGCTGCG
      ExbB <- GTA 5'

      GCAACCGCCTAATTCAATTCAAACCTGACGGGGACTTTAAACTCCGTCCAGGCATTGGCT
      TGAAATGCCCGTTTTGCGCCGCTTGGTGCAGCATTGTCCAACCGGAAAAACCACTG
      CTTTTCACGATTTTAAACGACTCAACATGACCGCCCGGAGAAACCAAAACGCTCAAAACA
55      ACCGTACCCTGCTCGTCATTCTCCATAGAAAGCGTGGGATAAGCCGGGCGCGGAATGCTG

      CCGTTGGCGCGTAAAGGATTGCCTTTGCTGCTGCGGCTCCTTCCCCTGTTTCGCCTTTG
      ACACCGCGCTACCTTTACCGCTGCCCTTCTCCGCGCCCGTTCCGTCTCCTTTGGTACCA
      GTTCCCTTATCTTCCCATTGCCCTGCTCGCTGTCTGCTTTGGCAGAAGCATTGCCGGGA
      TGTTCCGCGAGGTTTTTCAGACGGCTTCTCGACCGGTTTTTCCGCGGTTTCGGGACAGGC
      TTCGCTTCCGGCTTAGGCTCTGGTTTCGGTTTTCTTCGGGTTTCGGCTTTCTTCAGGT
      TTCGGCTCTTCCTTAGGCTGCTGAATATCCGCATCCGCTTTTTCGTAACCAACCGCTTC
      AAAACCGGCTTGGGCGGCTCGACAGGTTTGGGCGGCTCGGGCAGGGTTGCGGTTTCGGC
      GCAGCAGGCGCGCTGCACCTTCGGGGGCGCGTCCCTCCGCCAAAATCGCCCAAATCG
      ACAAAATCAATAACATTGCCCTGACTCTATCACGGGCAGCTTGTGCGCTGCGAGCAAT
      GCCACCATTGCCAAATGCAGCAGTGCAGACGAAACACGACTGCGGGGGTTAAATTCGT
      TCTTTATCCATAATTCCGGGCATAATAATAGCAACAATTCCTATTGCAACCTATTTTAC
      AATTTTGGTCATATGAATGTCTGTCCGTTACAGGCAAA-3'
65

```

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 6

Secuencia de nucleótidos de la región de ADN (1000 pb) secuencia arriba del gen exbD de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

Secuencia de ADN de 1 kb secuencia arriba de ExbB de la cepa MC58 de NmB

```

5' -CATAATCAGCTATCCTTTTGATTAAAGCAGGCGGACGTGCAAATCGTGCGCCATCGCATC
ExbD < GTA -5'
CAATCCTGGGTCACTATTTTGTGCCCGGATGAGGAAGTTGTATGCCAACACCGCCGG
AATCGCCACGAACAAACCCGCGCGTCCGCCACAGTGCCCTCGCCAATCGGGCCGGCAAC
CGCCGCAATACTCATCTGCCCGCTTTGCCCGATATTGATCAGGGCGTGTTAAATCCCCCA
AACCGTGCCGAACAGCCCGATAAACCGGCGCGTCCGCCGATGAGGCAAGCGCGGTCTAT
CCCGTAATCAAAACCGGCGCATAACTCGCGCCATACTGTTGCGGATTTGAATGACCAAATA
CTCGTTCAACGGCAAAGCCTGCCCGAGTTCCGACGCTTCGTTTCGGCGGTAGTTGCGGTA
AGACTGCAATGCCCTCTTGCGCCAGTTTGGACAAAGCGCATCGACGGCGCGCACTTTTTC
GACCGCGTCTGTTTCAAGCAGAAAGTATCGCGCATATGCGGTTTGACGGCGGCATTCCCTTT
GCGCGCCCGATACAGCTTGATGCGAGCAAGACAACCAACACCAAGTTACGATACCTCAT
CAACAGCATCAACACAACACACCAATCAGGACGGGATCGCCCGATTCAAACTAATTT
CAATTCATAATGATTCCAACACTGAAAAAACCAATCAACATCCAAGCTGCGCGAAACC
GTGCGGCAACCGCTTAATTCAATTCAAACTTGACGGGGACTTTAAACTCCGTCCAGGCA
TTGGCTTGAAATGCCCGTTTGGCGCGCTTGCGTGCCGCAATTGTCCAAACCGGAAAAA
CCACTGCTTTTACGATTTTAAACGACTCAACATGACCGCCCGGAGAAACCAAAACGCTC
AAAACAACCGTACCTGCTCGTCACTTCTCCATAGAAAGCGTGGGATAAGCCGGCGCGGA
ATGCTGCCGTTGGCGCGTAAGGATTGCCTTTGCTGCTGCCGGC-3'

```

SEQ. ID NO: 7

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de rmpM de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

Nº de acceso de RmpM (también llamado OMP4 en *N. meningitidis*)

Cepa Nm MC58 (serogrupo B): (secuencias de ADN y proteína)

```

>NMB0382
ATGACCAACAGCTGAAATTAAGCGCATTATTCGTTGCATTGCTCGCTTCCGGCACTGCT
GTTGCGGGCGAGCGTCCGTTCAAGGTTACACCGTAAGCGGCCAGTCGAACGAAATCGTA
CGCAACAACTATGGCGAATGCTGGAACAAACGCTACTTTGATAAAGCAAGCCAAAGTCCG
GTAGAATGCGGCGATGCGGTTGCTGCCCCGAAACCGAGCCAGAACCCGAAACCCGCAACC
GCGCTGTCTGTTGTTGGAGCAGGCTCCGCAATATGTTGATGAAACCAATTTCCCTGTCT
GCCAAAACCTGTTCCGTTTTCGATAAGGATTCAATTGCGCGCCGAAGCTCAAGACAACCTG
AAAGTATTGGCGCAACGCTGAGTCGAACCAATGTCCAATCTGTCCGCGTCGAAGGCCAT
ACCGACTTTATGGGTTCTGACAAATAAATCAGGCCCTGTCCGAACCGCGCGCATACGTA
GTGGCAACAACCTGGTCAGCAACCGGTACCTGTTTCTAGAATTTCTGCTGTGCGCTTG
GGCAATCTCAAGCGCAATGACTCAAGTTTGTGAAGCCGAAGTTGCCAAACTGGGTGCG
AAAGTCTCTAAAGCAAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCATGTATCGAACCTGACCGCGT
GTGGATGTGAAATCCGCAGCATCGTAACCCGTCAGGTTGTGCCGGCACACAATCATCAC
CAACACTAA

```

SEQ. ID NO: 8

Secuencia de aminoácidos de RmpM de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

```

>NMB0382
MTKQLKLSALFVALLASGTAVAGEASVQGYTVSGQSNEIVRNNGECWKNAYFDKASQGR
VECGDAVAAPPEPEPEPEPAPVUVVVEQAPQYVDETISLSAKTLFGFDKDSLRAEQDNL
KVLAQRLSRTNVQSVRVEGHTDFMGSDKYNQALSERAYVVANNLVSNGVPVSRISAVGL
GESQAQMTQVCEAEVAKLGAKVSKAKKREALIACIEPDRRVDVKIRSIVTRQVVPANH

```

QH

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 9

Secuencia de nucleótidos de la región de ADN (729 pb) correspondiente al gen *rmpM* de *Neisseria meningitidis* serogrupo A, cepa Z2491

```

5
10
15
20
ATGACCAAACAGCTGAAATTAAGCGCATTATTCGTTGCATTGCTCGCTTCCGGCACTGCTGTTGCGGGCGAGGCGTCCGT
TCAGGGTTACACCGTAAGCGGCCAGTCGAAACGAAATTTGTACGCAACAATATGGCGAATGCTGGAACCAACCGCTACTTTG
ATAAAGCAAGCCAAGGTGCGGTAGAATGCGGCGATGCGGTTGCTGCCCCGAACCGAGCCAGAACCCGAACCCGCACCC
GCGCCTGTCGTCGTTGTGGAGCAGGCTCCGCAATATGTTGATGAAACCAATTTCCCTGTCTGCCAAACCCCTGTTGCGTTT
CGATAAGGATTTCATTGCGCGCCGAAGCTCAAGACAACCTGAAAGTATTGGCGCAACGCTGGGTCAAACCAATATCCAAT
CTGTCCGCGTCGAAGGCCATACCGACTTTATGGGTTCTGACAAATACAATCAGGCCCTGTCCGAACGCGCGCATACGTA
GTGGCAACAACCTGGTCAGCAACGCGGTACCTGTTTCTAGAATTTCTGCTGTGCGCTTGGGCGAATCTCAAGCGCAAAT
GACTCAAGTTTGTGAAGCCGAAGTTGCCAACTGGGTGCGAAAGTCTCTAAAGCCAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCAT
GTATCGAACCTGACCGCCGCGTGATGTGAAAAATCCGAGCATCGTAACCCGTGAGGTTGTGCCGGCACACAATCATCAC
CAACACTAA

```

SEQ. ID NO: 10

Secuencia de nucleótidos de la región de ADN (1000 pb) secuencia arriba del gen *rmpM* de *Neisseria meningitidis* (serogrupo B) - cepa MC58

Secuencia de ADN de 1 kb secuencia arriba de *RmpM* de la cepa MC58 de NmB

```

35
40
45
50
AAAAATGCCCGCGCGATGCTGCTGCCCGCATTGAATGCAAATTCATAAGTAATCAGCGGAA
ACCTCGCCAAATCTTCAATACGGAGGGGGTTTCTGCATTGAGCAAGGGGTGGTCTGTCG
GTACGATAACCGCATGAGTCCAGTCATAGCAGGGAAGTTTCCCAGTTCGGGATGGTCTGT
CTATCCGTTCCGTAAACAATCGCCAAGTCCGCCTCGCCTGAGGTAACCATACGTGCGATGG
CGGCAGGGCTCCCTGTTTGTATGGTCAGGTTGACTTTCGGATAGCGTTTCACAAAATCGG
CAACAATCAAGGGTAGGGCATAGCGTGCCGTGAGTATGCGTCGTGGCAACCGTCAGCGAAC
CGCTGTCCTGTCCGGTAAACTCGCTGCCGATATTTTAATGTCTGAACATCGCGCAAAA
TACGTTCCGCAATATCCAAAACCACTTGCCCGGCTGCGAGACCGAAACCGCGCTTGC
CGCTGCGGATAAAAAATCTGAATGCCGATTCTTCTTCCAGCAATTTGATTGTGTTGGAGA
TGCCGGGTTCGGAAGTAAACAAGGCTTCGGCCGCTTCGGAACCGTTCAGGTTGTGCTGGT
AAACTTCTAAGGCGTATTTCAATTGTTGTAATTTTCATGGCGGGTCCGTGTGGGTCTGTGT
CGGGTGGCTGAACATTGTTTATAATTTATCATATTTCTTGGCGGTACGGTATGGGGCTT
TGCCGTTGTGTTGTTGTTTGTGCAACGGCAATCGTGCATATGGAAAAATCCCCCT
AAAGTAATGACACGGAATTGATTTTTCGGCATGATAGACTATCAGGAAACAGGCTGTTT
ACGGTTGTTTTAGGCGTTGAGTATTGACAGTCCGCCCCCTGCTTCTTATAGTGGAGAC
TGAAATATCCGATTTGCCGCCATGTTCTACAGCGGCCTGTATGTTGGCAATTCAGCAGT
TGCTTCTGTATCTGCTGTACAAATTTAATGAGGGAATAAAATGA ATG-3'
RmpM

```

Secuencia de nucleótidos:

Tol Q: complemento (5168..5854) debajo de SEQ ID NO: 11 - cepa *H. influenzae* HiRD

Tol R: complemento (4677..5096) debajo de SEQ ID NO: 13 - cepa *H. influenzae* HiRD

Tol A: complemento (3543..4661) debajo de SEQ ID NO: 15 - cepa *H. influenzae* HiRD

Tol B: complemento (2218..3501) debajo de SEQ ID NO: 17 - cepa *H. influenzae* HiRD

ES 2 327 496 T3

gagtttttta
 2221 ttttagttaag tatggagacc aagctggaaa ttttaacttga ccatcacttc ctggaaggct
 2281 cgccttaaaag cgaccatctg cggaaaccaa ttgtagcacc tttcctaagc cctgtgtaga
 2341 actataaata atcataattc catttggaaga gaggcttggg ctttcgccta gaaaagatgt
 2401 actaagtacc tctgaaacgc ccgttgtaga atcttgttta actacattat tgttaccatt
 2461 aatcatcaca agtgtttttc catctgcact aatttgtagc ctaccgcgac caccactgc
 2521 tgttgcacta ccaccgcttg catccattcg ataaacttgt ggcaaacac ttctatcgga
 2581 tgtaataaaa attgaatttc cgtctggcga ccacgctggt tcagtattat taccgcacc
 2641 actcgtcaat tgagtaggtg tacgcgcatt tgctccata acgtaaatat tcagaacacc
 2701 atcacgagaa gaagcaaaaag ctaaacgaga accatctggc gaaaaggctg gtgcgcatt

 2761 atgcccttga aaagatgcc aacttttacg tgcgccagaa ttttaaatcct gtacaacaag
 2821 ttgtgatttt ttattttcaa acgatacata agccaaacgc tggcgcgtctg gagaccaagc
 2881 tggagacata attggttggg cactacgatt gacgataaat tgattatagc catcataatc
 2941 tgctacacga acttcataag gttgcgaacc gccatttttt tgcacaacat aagcgatagc
 3001 agttctaaag gcaccacgga tcgcagttaa tttttcaaaa acttcacgcg tcacagtagt
 3061 cgcgccatag cgtaaccatt tatttgttac tgtatagcta ttttgcatta atacagtccc
 3121 tggcgtacct gatgcaccaa ccgtatcaat taattgataa gtaatactat aaccattacc
 3181 cgatggaacc acttgcccaa ttacaattgc gtcaattcca atattcgacc aagcctcagg
 3241 atttacctct gcagctgaag ttgggcgttg aggcatttga gaaaccgcaa taggattaaa
 3301 cttaccactg ttacgtaaat catctgcaac aattttacta atatcttctg gtgcagaacc
 3361 aacaaatggc acgacagcaa taggacgcgc accatcaacc ccttcacaa tgacaatcgc
 3421 tacttcatcg ccagcgaatg cattgtcttc aacagcaagt acaatcgga acagctcac
 3481 taaacgtttt aataatttca ttttgttacc tttaaaattt aacaataaat ttttctaaag
 3541 aattatcgaa tatcaaagtc aataattggt gatttatatt tttcataaat ttcattctgat
 3601 ggccgcagctg gaactttttt cgttctagcc accgcactta atgcagctga acaaatatca
 3661 tcagagcctg aaattttttg ataccceaag attgtgcat ctcgacctaa ttgaatttta
 3721 atacgacaaa cctttcctgc aaaatttgga tcttttaaga aacgacgttg aatctctttc
 3781 ttaattacac ctgcgtattg atccccaacc ttaccaccat cgccagagcc aagtgcagca
 3841 ccgctacctt gagttccacc tttatttgtg tttccccctt tagatgcact accgccacca
 3901 atatctccgc catttaagaa atcatctagg cttgcttgat ctgctttacg tttcgtctcc
 3961 gtacgagctt tagcttctgc atcagctttt gcttttgctt ctgctgcgcg ttcgctttct
 4021 gcctccgctt cagcctttgc tttagcttca gcaacggctt ttgccttagc ttcggttctt
 4081 agtttcgcct tagcttccgc ctcttgtttt gctttttgag cagcaatttc tgctgctttc
 4141 gcttttagcct ctcttccagc ttgttttgcc gcggcagcta aacgttttag ctctgcatct
 4201 gctttttaatt ttgcagcttc agccgcttgt tttagccttag cctcttcagc ttgcttctgt
 4261 ttttccaacg ctcttggacg agcttgctct tgttgttttt ttatttcttg ctgacgttgc
 4321 tgttcttctg gacgttttaa ctcttcttgt cgttgaaact ctgtgtgatg cttaatctct
 4381 tcttgattag gctcaggtgg tttttcttcc acaacaggtt ctgggcgttt ttgtttatcc
 4441 gcttgccctt tttttgttg ttgaatacgc ccccatctct gagcagccgt accagtatca
 4501 acaatcactg cccctattac atctcttca ccttctccac caccataat ttcaacagtg
 4561 tgataaagtg agcttaaaat caataagcaa aacaagataa agtgcaaaag gatagaaata
 4621 gcaaaagcat tgattccttt cttttgttga ttattttgca cgtgttacct acttagctaa
 4681 atgggatttg tcattaaacc tacagattta atgcctgcaa gatgaagtaa attcaatgcc
 4741 ttaatcactt cttcataagg tacttcttta gctccgccta ctaaaaatag cgtattatta
 4801 tccttatcaa attcctgtct agataattga gtaaccattt cttctgttaa accttcttga
 4861 cgttctccgc caatagaaat cgcataattt ccaatgcctg ccacttcaag aatgacgggt
 4921 actttatctt cattagaaac ctcttggtt tgcacagaat caggcaattc aacttgaacg
 4981 ctttgactaa taataggggc ggttgccata aaaattaaca ctaaaactaa aagcacatct
 5041 aaaaaaggca caatattaat ttcagattta attgctttac gctgacgacg agccatata
 5101 tcctctaaaa ttttaactta tttttaccgc actttttctt caaagtgcgc tcaattttcc
 5161 ctatatttta gtgaggggtt ttaccacagg cttgacggtg taaaatcgct gtaaatttcc
 5221 caataaaatt accgtaatct tgttcaatgg cattcactcg taagcttaaa cggttataag
 5281 ccattactgc aggaattgcg gcaataaac caatcgcagt ggcaatcaag gcctcagcga
 5341 tacctggcgc taccatctgt aacgttgctt gttttgcacc acttaatgcc ataaaagcgt
 5401 gcatgatacc ccaaacagtg ccgaataaac caatataagg gctaacagat gccactgtgg
 5461 ctaaaaatgg aactcggttt tccaaacttt caatctcacg gttcatcgca agattcatcg
 5521 cgcgcattgt gcctttaata atcgcttcag gtgcactctg atttacttgt tttaaacgtg
 5581 aaaattcttt aaatcccacg caaaaaattt gttcgctgcc cgtaaatcca tcgcgacgat
 5641 tagatagccc ttcataaagt ttatttaaat cttctcttga ccagaaacga tcttcaaacg
 5701 tacgcgcttc ttttaaggca ttcgttaaaa tacgactacg ttgaatgata attgcccag
 5761 atatgattga gaaagaaatc aaatcacaac ttaccagttg cacaacaata cttgctttta
 5821 gaaaaagatc taaaaaattc aattctgcag tcattgcata

ES 2 327 496 T3

SEQ ID NO: 12 - secuencia de aminoácidos de TolQ - cepa *H. influenzae* HiRD

MTAELNFLDLFLKASIVVQLVIVILISFSIISWAIHQSRILT
NALKEARTFEDRFWSGEDLNKLYEGLSNRRDGLTGSEQIFCVGFKEFSRLKQVNPDPAP
EAIKGTMRAMNLANMREIESLENRVPLATVASVSPYIGLFGTVWGMHAFMALSGA
KQATLQMVAPGIAEALIAAIGLFAAPAVMAYNRLSLRVNAIEQDYGNFIDEFTTIL
HRQAFGKAPH

SEQ ID NO: 14 - secuencia de aminoácidos de TolR - cepa *H. influenzae* HiRD

MARRQRKAIKSEINTVPFLDVLLVLVLFMATAPIISQSVQVEL
PDSVQSQEVSNEDKVPVILEVAGIGKYAISIGGERQEGLTEEMVTQLSRQEFDKDNNT
LFLVGGAKEVPYEEVIKALNLLHLAGIKSVGLMTNPI

SEQ ID NO: 16 - secuencia de aminoácidos de TolA - cepa *H. influenzae* HiRD

MQNNRQKKGINAFAISILLHFILFGLLILSSLYHTVEIMGGGEG
EGDVIGAVIVDTGTAAQEWGRIQQKKGQADKQKRPEPVVEEKPPPEPNQEEIKHQQEV
QRQEELKRQEQQRQKEIKQQEQARQEAELEKQQAEEAKAKQAEEAAKLKADAEAKR
LAAAAKQAEEAAKAKAAEIAAQKAKQEAEEAKAKLEAAEAKAKAVAEAKAKAEAEAKAKA
AAEAKAKADAEAKAAEAERKADQASLDDFLNGGDIGGGSASKGGNTNKGQTQGSAA
LGSGDGGKVGDQYAGVIKKEIQRRFLKDPNFAGKVCRIKQLGRDGTILGYQKISGSD
DICSAAALSAVARTKKVPAAPSDEIYEKYKSPIDFDIR

SEQ ID NO: 18 - secuencia de aminoácidos de TolB - cepa *H. influenzae* HiRD

MKLLKRLVSVFAIVLAVGSNAFAGDEVRIVIDEGVDGARPIAVV
PFVGSAPEDISKIVADDLRNSGKFNPIAVSQMPQRPTSAAEVNPEAWSNIGIDAIVIG
QVVPSGNGYSITYQLDITVGASGTPGTVLMQNSYTVTNKWLRYGAHTVSEVFEKLTA
IRGAFRTRIAVYVQKNNGGSQPYEVRVADYDGYNQFIVNRSAPIMSPAWSPDGQRLAY
VSFENKKSQLVVQDLNSGARKVVASFQGHNGAPAFSPDGSRLAFASSRDGVLNIYVMG
ANGGTPTQLTSGAGNNTPEAWSPDGNSILFTSDRSGSPQVYRMDASGGSATAVGGRGS
AQISADGKTLVMINGNNNVVKQDLTTGVSEVLSTSFLLGESPSLSPNGIMIIYSSTQGL
GKVLQLVSADGRFKASLPGSDGQVKFPAWSPYLTK

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 19

Secuencia de nucleótidos de la región de ADN (1000 pb) secuencia arriba del operón TolQRAB de *H. influenzae* - cepa HiRD

Secuencia promotora (1000 nt) secuencia arriba: secuencia complementaria (atg en negrilla)

```

5
10      tgatgaaacg cgcgtttaac ttctttggga aacgccactg gtttcacatt cccgaaaaa ttattttaag 5881
      acacaggcta ccttaacagt agcctttgat aacatcaggg tgttgcgcat cagtctctgt 6001
      tcaaaaagga ttgtagcccc ttttacttct gaaacctctg tttccaccat aagtaaataca 6061
15      tccaattttg ctgccacgca ataataaatg gcgagcggtt tgacaacaaa tgcgagttgt 6121
      tgttcctcta gtaaggtttg ttgcgtaaaa tttaattgtac gcaaataattc tgttcttgct 6181
      cgttcaaaaa aatgcaaata gcgagcggtg tacactacgc cacctgcac cagtatttca 6241
20      taatacacac gaacaggaaa agaaaagcca ttatccaaca tattctcacc caattggctg 6301
      caataaaccg tgtattctag aaccagtttt tgggataagc aagctatcta tgaaaaactc 6361
      aataagattt tattcatttt aaaacatcta aaatttttac cgcactttta gcctgactag 6421
      caaaagataa ggtaatgaca aatcattttt aacctttctc attgagtaaa atctattcaa 6481
25      aacataaccg ttcttttaaaa atagcctcta tgtaattcta agccaccagt atttttattc 6541
      ttgatattta gcgtttctat gcgacaatct ttgcggttat ttactttaaa aatatgtttt 6601
      actagatgga ttacgaaaat caaattgcc aatattttctc actaaatggc gaattaagcc 6661
30      aaaatatcaa aggttttctg cctcgagctg aacaactga aatggcatat gctgtaggta 6721
      aagcaattca aaataaatct tcccttgta ttgaagctgg aacgggtaca ggaaaaacct 6781
      ttgcatatct cgcacctgct ttagtttttg gtaaaaaaac

```

SEQ. ID NO: 20

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de P5 de *H. influenzae* no tipificable

```

45      ATGAAAAAACTGCAATCGCATTAGTAGTTGCTGGTTTAGCAGCAGCTTCAGT
      AGCTCAAGCAGCTCCACAAGAAACACTTTCTACGCTGGCGTTAAAGCTGGTC
      AAGCATCTTTTACGATGGACTTCGTGCTCTAGCTCGTGAAAAGAATGTTGGT
      TATCACCGTAATTCTTTCACCTATGGTGTATTTCGGTGGTTATCAAATTTTAAA
      TCAAATAACTTAGGTTTAGCGGTTGAATTAGGTTACGACGATTTCGGTTCGTG
50      CCAAAGGTCGTGAAAAAGGTAGAACTGTTGCTAAACACACTAACCACGGTGCG
      CATTAAAGCTTANAAGGTAGCTATGAAGTGTAGAAAGGTTTAGATGTTTATGG
      TAAAGCAGGTGTTGCTTTAGTTCTGCTGACTATAAATTGTACAATAAAAATA
      GTAGTACTCTTAAAGACCTAGGCGAACATCACAGAGCACGTGCCTCTGGTTTA
      TTTGCAGTAGGTGCAGAATATGCAGTATTACCAGAATTAGCAGTTTCGTTTGA
55      ATACCAATGGCTAACTCGCGTAGGTAAATACCGCCCTCAAGATAAACCAAATA
      CCGCAATTAATAACAACCTTGGATTGGTTCTATCAACGCAGGTATTTCTTAC
      CGCTTTGGTCAAGGCGAAGCACCAGTTGTTGCAGCACCTGAAATGGTAAGCAA
      AACTTTCAGCTTAAATTCTGATGTAACCTTTTGCATTTGGTAAAGCAAACCTAA
      AACCTCAAGCGCAAGCAACATTAGACAGCGTCTATGGCGAAATTTCAAGGTT
60      AAAAGTGCAAAAGTAGCGGTTGCTGGTTACACTGACCGTATTGGTTCTGACGC
      GTTCAACGTAAACTTTCTCAAGAACGTGCAGATTTCAGTAGCTAATACTTTG
      TTGCTAAAGGTGTTGCTGCAGACGCAATCTCTGCAACTGGTTACGGTGAAGCA
      AACCCAGTAACCTGGCGCAACTTGTGACCAAGTTAAAGGTCGTAAAGCACTTAT
      CGCTTGTCTTGTCCAGACCGTCGTGTAGAAATCGCGTTAAACGGTACTAAA
65

```

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 21

Secuencia de aminoácidos de P5 de *H. influenzae* no tipificable

MKKTALVAVAGLAAASVAQAAPQENTFYAGVKAGQASFHDGLRALAREKNVG
YHRNSFTYGVFGGYQILNQNNLGLAVELGYDDFGRAGREKGRTVAKHTNHGA
HLSLXGSYEVLEGLDVYKAGVALVRSYKLYNKNSSTLKDLEHHRARASGL
FAVGAEYAVLPELAVRLEYQWLTRVGKYPQDKPNTAINYNPWIGSINAGISY
RFGQGEAPVVAAPPEMVSCTFSLNSDVTFAFGKANLKPQAQATLDSVYGEISQV
KSAKVAVAGYTDRIQSDFNVKLSQERADSVANYFVAKGVAADAI SATGYGEA
NPVTGATCDQVKGRKALIACLAPDRRVEIAVNGTK

SEQ. ID NO: 22

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de P6 de *H. influenzae* cepa HiRD

atgaacaaatttgttaaattcattatttagttgcaggttctgtagctgcattagcagctttagtctcatct
aacaacgatgc
tgcaggcaatggtgctgctcaaacttttggcgggtactctgttgctgatcttcaacaacggttacaatac
cgtttatttcg
gttttgataaatatgacattactggtgaatacgttcaaactcttagacgcgcacgctgcatatttaaattg
caacgccagct
gctaaagtatttagtagaaggtaaacactgatgaacgtggtacaccagaatacaacatcgcataggccaa
cgtcgtgcaga
tgcagttaaagggttatttagctggtaaagggtgttgatgctggtaaattaggcacagtatcttacggtga
agaaaaacctg
cagtattagggtcatgatgaagctgcatattctaaaaacgctcgtgcagtggttagcgtac

SEQ. ID NO: 23

Secuencia de aminoácidos de P6 de *H. influenzae* cepa HiRD

MNKFVKSLLVAGSVAALAAACSSSNDAAGNGAAQTFGGYSVADLQORYNTVYF

GFDKYDITGEYVQILDAAAYLNATPAAKVLVEGNTDERGTPEYNIALGQORRA
DAVKGYLAGKGVDAKGLGTVSYGEEKPAVLGHDEAAYSKNRRAYLAY

SEQ. ID NO: 24

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de P6 de *H. influenzae* no tipificable

>p6nthipatient.SEQ
ATGAACAAATTTGTAAATCATTATTAGTTGCAGGTTCTGTAGCTGCATTAGCG
GCTTGTAGTTCTCTTAACAACGATGCTGCAGGCAATGGTGCTGCTCAAACCTTT
GGCGGATACTCTGTTGCTGATCTTCAACAACGTTACAACACCGTATATTTGGT
TTTGATAAATACGACATCACCGGTGAATACGTTCAAATCTTAGATGCGCACGCA
GCATATTTAAATGCAACGCCAGCTGCTAAAGTATTAGTAGAAGGTAATACTGAT
GAACGTGGTACACCAGAATACAACATCGCATTAGGACAACGTCGTGCAGATGCA
GTTAAAGGTTATTTAGCAGGTAAAGGTGTTGATGCTGGTAAATTAGGCACAGTA
TCTTACGGTGAAGAAAACCTGCAGTATTAGGTACGATGAAGCTGCATATTCT
AAAACCGTCGTGCAGTGTAGCGTACTAA

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 25

Secuencia de aminoácidos de P6 de *H. influenzae* no tipificable

>p6nthipatient.PRO

MNKFVKSLLVAGSVAALAACSSSNDAAGNGAAQTGGYSVADLQORYNTVYFG
FDKYDITGEYVQILDAAHAYLNATPAAKVLVEGNTDERGTPEYNIALGQRRADA
VKGYLAGKGVDAKLGTVSYGEEKPAVLGHDEAAYSKNRRAVLAY.

SEQ. ID NO: 26

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de pcg de *H. influenzae* cepa HiRD

PCP de HiRD

ATGAAAAAAAAACAAATATGGCATTAGCACTGTTAGTTGCTTTTAGTGTAAGTGG
TTGTGCAAATACTGATATTTTCAGCGGTGATGTTTATAGCGCATCTCAAGCAA
AGGAAGCGCGTTCAATTACTTATGGTACGATTGTTTCTGTACGCCCTGTTAAA
ATTCAAGCTGATAATCAAGGTGTAGTTGGTACGCTTGGTGGTGGAGCTTTAGG
TGGTATTGCTGGTAGTACAATTGGCGGTGGTGGTGGTCAAGCTATTGCAGCAG
TAGTTGGTGCAATTGGCGGTGCAATAGCTGGAAGTAAAAATCGAAGAAAAAATG
AGTCAAGTAAACGGTGCTGAACCTGTAATTAAGAAAGATGATGGTCAAGAGAT
CGTTGTTGTTCAAAAGGCTGACAGCAGTTTTTTGTAGCTTGGTCGCCGAGTTCG
TATTTGTTGGTGGCGGCTCAAGCTTAAATGTTTCTGTGCTA

SEQ. ID NO: 27

Secuencia de aminoácidos de pcg de *H. influenzae* cepa HiRD

MKKTNMALALLVAFSVTGCANTDIFSGDVYSASQAKEARSITYGTIVSVRPVK
IQADNQGVVGTGGLGALGGIAGSTIGGGRGQAIAAVVGAIGGAIAGSKIEEKM
SQVNGAELVIKDDGQEIIVVQKADSSFCSLVAEFVFGGSSSLNVSVL

TolQ 22100-22789 debajo de SEQ ID NO: 28 - *Moraxella catarrhalis*

TolR 22185-23250 debajo de SEQ ID NO: 30 - *Moraxella catarrhalis*

TolB 24097-25359 debajo de SEQ ID NO: 34 - *Moraxella catarrhalis*

TolX 23253-24080 debajo de SEQ ID NO: 32 - *Moraxella catarrhalis*

La secuencia 21051-25650 también es una secuencia de nucleótidos adicional de la invención, en particular la región de 1000 pb secuencia arriba del codón de inicio del gen TolQ.

MCA1C0024 Longitud: 33248 Tipo: N Comprobar: 1253..

ES 2 327 496 T3

21051 GGGTGATAGC GCACCTCAAC AGGATAGCTA CGACCCTCGA CAATATACAC
 21101 AGGTGCAGGT TTGCCATTCTG CTGCAAAATA GTCAGAAAAC CTTTGGGTGT
 21151 CTAAAGTGGC GGAGGTGATG ATAACTTTTA GATCAGGGCG TTTGGGTAAA
 21201 AGACGCTTTA AATAGCCCAT GATAAAATCA ATATTTAAGC TACGCTCATG
 21251 TGCTTCATCA ATGATGATGG TATCATAATT TGCCAAAAC TTATCAGAGC
 21301 CCAATTCAGC AAGTAAAATC CCATCTGTCA TCAGCTTGAC AATAGAGTGC
 21351 TTGCCACCTT CTTGCGGTGAA GCGAATCTTA AAACCTACCG TCTGACCAAG
 21401 TGGCTCGCCA AGCTCTTCAG CGATACGCAT CGCTACCGAG CGTGCAGCCA
 21451 ATCGGCGTGG CTGTGTGTGG CCAATTGAC CTGTGATGCC ACGCCCTGCC
 21501 ATCATAGCAA GCTTAGGCAG TTGCGTGGTT TTGCCAGAAC CCGTCTCACC
 21551 TGGGATAATC ACCACTTGAT GATCACGGAT CGCTTGAATT AGCGTATCGG
 21601 CTTCAGCAGT CACGGGCAAA TCATGATTAA GTTTTCTGA TAGATTTTTT
 21651 GGTATGCTAT CCATACGATT GGCGACCTGT TCGGCAGATC GCTCATAGAT
 21701 AGCATCATAG CGTATTTTGC ACTTAGTTTT TAGATCGCCT GTGGTAGAAT
 21751 TCATTTTCTG TTTTAGTTTT TTTAAATAAT GTCTGTCTTT GGCAAGGACT
 21801 GGTAAATTAT CGGTAGAATG CATATTTTTA AATGATAGTT ATCTTATAAA
 21851 GGGTATGAAA AAGCATCAAT TTAAGTACAT TGATACATCA GATTTTATTT
 21901 TATTCATGGG TCTATATGAG GGCTTGGACG CATGAATAAA CCATGTATTG
 21951 TAAATAAAAT CATCAAAACC TGCAATTTTC TATTTAAATG GCGATTTTAG
 22001 GGCGATAGAC AAGCGATGAC TTTTGGCCA TCTGTCGCAA ATTTATTAAC
 22051 TTATGCTATA ATGCCAAGTA TCTTTTTTTG CCTATTGTGA TTGTCAATTG
 22101 TGAACGAATC CATTAGCCTA ATCTCGCTGG TCATTGAAGC AAGCGTTGTT
 22151 GTTAAATTGG TCATGGCGAT ACTGCTTTTG CTGTCTACAA TCAGTTGGGT
 22201 ACTGATTTTT CATCTGGGTA CCAAATTGG CGGTATTGCC AAGTTTGATA
 22251 AGCGATTTGA GCGATGGTTT TGGACTGATG ATATCGATCA TCAGCTGTCT
 22301 GTTGTGCAAG CAGAATCAGA GCGTGCAGGG CTTGAGCTGA TTTTTTATAC
 22351 AGGTTTTTAT GATCAAAATC ACCAAGACCA AGATTCTTCA CTAAGTGATG
 22401 ATAAAAAAGT GCAAATCGTT GAGCGTCGCT TGCATATGGC ATTAGGCAGT
 22451 GAGCAGGTGC ATCTTGAAAA AGGATTATCA ACGCTTGCAA CGATTGGTTC
 22501 TGTTCACCT TATATCGGAC TATTTGGTAC AGTATGGGGC ATTATGAATG

ES 2 327 496 T3

22551 CATTTATTGG CTTGGGTCAA GCCGAATCGG TTGGTCTTGC AACCGTTGCA
 22601 CCGAGCATTG CTGAGGCATT GATTGCAACA GCACTTGGTT TATTTGCGGC
 5 22651 CATTCCTGCG ACGATGGCAT ATAATCACTT TGCCACCAA TCCAATACAC
 22701 TGTATGAAAA TCGTAGCCTA TTTTGTGAAG GCTTAATAAG TGCATTGGTG
 10 22751 ACAAATCTGG CAAAAAGAA CACCGCATCA ACTTTATAGA GCATACTATT
 22801 TTATAGAGCA TATTATGGTA ACTTCCAATC GATTGCTCG TCGCCAAAGA
 22851 CCGCTAAATA GTGACATGAA TGTGTGCCT TACATTGATG TGATGTTGGT
 15 22901 GCTTTTGGTG ATATTTATCG TAACAGCACC AATGCTTGCT ACAGGTATTG
 22951 AGGTATCACT GCCAAAAGAG CAGACCAAAC CCATCACACA AGCTGACAAG
 23001 CTGCCTGTCA TTGTCAGCAT TCAGGCAGAT GGCAATCTGT ATGTCAGCCA
 20 23051 TAAAAATGCC ATCGATGTGC CAATCACGCC TGACAAGCTA GATACCTGCG
 23101 TACGCCAGAT GCACCAAGAC AATACCGATT TACAAGTGAT GGTCAATGCC
 23151 GATGCAGATA ATGCCTACAG CCGAATTATG CAGATTATGG CATTGATTCA
 25 23201 AAATGTTGGT ATCACCCAAG TGAGTTTGCT TAGCGAATCT GTTCAATAT
 23251 GCGTATGATAAT TCATAAGGCA AATCAATCGA TCGGTTTATC CGATAATCAT
 30 23301 CCAACAGTCA ATTTTGATAA ATCTGCGCTA ATTTTACCAA TTTTAGCCAG
 23351 TGTTTTATTA CATACCGTCA TCATCATAGC GGTAGCAGCA CCACTGATTA
 23401 CACCGCCTAC TAAGCCTAAT ACTACTATTC AGACCGCTTT GGTAGGTCAA
 35 23451 GAGGCTTTTA ATCGTGCCAA GACGGCCTTG AGCAATCATC ATGCCAATCA
 23501 AAACAAGCCA ACTGCCACCA ACACTTCAAG TACCATCACT GCCAATGATA
 23551 ATGATAATGC ATTTATGCAA GCTCAAATC AGCATCGTTA TCACCCACAG
 40 23601 GTTCTACTT CTGCCACCAC GACCCAAGCG TATCATCCAC CACCCAATC
 23651 AGCACCTTT GAATCAAAT CACCAAATAT ACAAATCAA CCAACAAACG
 45 23701 CTCACGCCAA GCTGGCTGAA TATTCTAATC ATGTCTCAGA CCTTGAGCAG
 23751 TCAAATCATA CCGAGTCTAC GCCAAGCCGA GCACAAATCA ATGCCGCCAT
 23801 CACCTCGGTC AAACATCGTA TTGAAGCCAT TTGGCAACGC TATCCTAAGC
 50 23851 AGCCCAATCA AACCATCACC TTTCAGGTTA ATATGAATCA ACAAGGCGAT
 23901 GTGACCTCAA TCCAATTCGG TGGTGGCCAT CCTGATTGTC GTGAATCTGT
 23951 AGAAGCGGCG GTATATGCTG CCGCACCATT TTATGAATTT GGCGGTATGC
 55 24001 GTGACAGTAT CCGCCTGCAG TTCACCACAG AGCAGCTAAT TATGGATAAT
 24051 AACCAAACAA CCAATGAGCC TAATCACTAA TCGCCATGGA GTTTTATGA
 60 24101 AATCACCCAT TACCAAAGTT TGCCTTGCTC TGACCATAAG CTTTTCTGCC
 24151 GCTTTGACGC AACTTATGC TGATGATGAA TTGATTGTGA TTAGCGAACA

ES 2 327 496 T3

24201 AGTTGCTCCG AGTCAATACC CCGTGGCAGT CATGCCTTTT TCAGAAGCTC
 5 24251 ATCAAATGAG TCATTATCTA AGCCTGGCAG GTCTTGGTAC TACTCACCAA
 24301 AACCTGCCAC AGCACACTCA GACGAATAGC GACATTCTGA ATAATCTGAC
 24351 CGCATGGCGT AACCGAGGAT TTGAATATAT TATTTTGGCA CAGTCGCATC
 10 24401 AAATTTTGGG AAATAAGCTT GCAATTAACT ATGAAAATTAT TGATACTGCC
 24451 AATGGTTTGG TAAGCGTCAA GCATACCCAA ATTAGCGATA ACCACCCTGC
 15 24501 TTCTATCCAA GCTGCCTATC GTCAAATCAG CGATACAATC TATCAAATCA
 24551 TCACAGGCCA GCCATCAGAT TTGATGGGTA AAATCGCCTA TGTGGAAGAA
 20 24601 AGCGGATCGC CACAAAATAA AATCTCATCT CTTAAATTGA TTGATCCAAG
 24651 CGGTCAGCTT ATCCGTACGC TAGATACCGT CAATGGATCA ATTATAACGC
 24701 CGACATTTTC CCCCAGATGGC TTGAGTATTG CTTATAGTGT ACAAACAAAA
 25 24751 AATAATCTGC CCATCATTTA TATTGTGTCT GTATCAGGTG GCACACCAAA
 24801 GCTCGTCACG CCATTTTGGG GTCATAATTT GGCACCAAGT TTTTCACCAG
 24851 ATGGTAGCAG TATCTTATTT TCAGGTAGCC ACGAGAATAA TAACCCGAAC
 30 24901 ATTTATCGTC TTAATTTACA TACCAATCAC TTAGATACGC TCACTACATT
 24951 CAACGGTGCT GAGAATGCAC CAAATTATTT GGCAGATGCG TCAGGATTTA
 35 25001 TTTTACTGTC TGATAAAGGT ACACGCCGCC AAAGCCTATA TCGCTATGAT
 25051 TTTGGCACGA CGCATAGCAC CCAAATCGCC TCTTATGCCA CCAATCCACG
 40 25101 CTTAAGCCCA GATGGATCAA AGCTTGTATA TTTATCAGGT GGACAAATCA
 25151 TCATCGCCAA TACCAAAGGC CGTATCCAAC AAAGTTTTAG GGTGTTAGGC
 25201 ACTGATGTAT CAGCCAGCTT TTCACCATCA GGCACACGGA TTATATATAC
 45 25251 ATCCAACCAA GGCAATAAAA ACCAGCTGAT GATCCGTTTCG CTATCAAGTA
 25301 ATGCCATACG CACCATCCCA ACATCAGGCA CGGTGCGTGA TCCGATTTGG
 50 25351 TCAAAATAAT GCCAATGAGT ATCCCAACTA AGGCGACAGT CGGCTATACC
 25401 CAAAGGCGGT TATTTATGGT CAGTATGACA GTTGGCCTGA TCAGCTTGAG
 55 25451 TGGGTGTCAG CACATTCAAG TGACCAAAAAG CCCAATACCG ATCATCATCC
 25501 ATAGCCATAC AAAATCGCCA TCTCAGCCTA AACCTACACC AACTGACGCC
 25551 GTGCCTACCA AAAACCGCCC AATCTCCCCA CCAACACAAA AGTCCAATAC
 60 25601 GATATTTATT TTGGAAGATT GGTTTTAGGC AGTTTTGGTA GATTCAAAAT

65

ES 2 327 496 T3

SEQ ID NO: 29 - secuencia de aminoácidos de TolQ de *M. catarrhalis*

!!AA_SECUENCIA 1.0

Traducción de: contig24.txt comprobar: 1253 de: 22100 a: 22786

símbolos generados 1 a: 229.

MCA1c0024

tolQ-Mcat.pep Longitud: 229, 22 de diciembre, 1999 09:12 Tipo: P Comprobar: 2526..

```
1  MNESISLISL VIEASVVVKL VMAILLLLST ISWVLIFHLG TKIGGIAKFD
51 KRFERWFWTD DIDHQLSVVQ AESERAGLEL IFYTGFDQON HQDQDSSLSD
101 DKKVQIVERR LRMALGSEQV HLEKGLSTLA TIGSVSPYIG LFGTVWGIMN
151 AFIGLGQAES VGLATVAPSI AEALIATALG LFAAIPATMA YNHFATKSNT
201 LYENRSLFCE GLISALVTNL AKKNTASTL
```

SEQ ID NO: 31 - secuencia de aminoácidos de TolR de *M. catarrhalis*

!!AA_SECUENCIA 1.0

Traducción de: contig24.txt comprobar: 1253 de: 22815 a: 23246

símbolos generados 1 a: 144.

MCA1c0024

tolR-Mcat.pep Longitud: 144, 22 de diciembre, 1999 09:13 Tipo: P Comprobar: 507..

```
1  MVTSNRFARR QRPLNSDMNV VPYIDVMLVL LVIFIVTAPM LATGIEVSLP
51 KEQTKPITQA DKLPVIVSIQ ADGNLYVSHK NAIDVPITPD KLDTLRQMH
101 QDNTDLQVMV NADADNAYS R IMQIMALIQN VGITQVSLLS ESQ
```

SEQ ID NO: 33 - secuencia de aminoácidos de TolX de *M. catarrhalis*

```
MIHKANQSMRLSDNHPTVNFDKSALILPILASVLLHTVILIAVAAPLITPPTKPNTTIQTALVGQEA
NRKATLSNHH
ANQNKPTAINTSSTITANDNDNAFMQAQONQHRYHPQVSTSATTTQAYHPPPN SAPFESNSPNIQNQPTN
AHAKLAEYSNH
VSDLEQSNHTESTPSRAQINAAITSVKHRIEAIWQRYPKQPNQTITFQVNMNQGDVTSIQFGGGHPDL
RESVEAAVYAA
APFYELGGMRDSIRLQFTTEQLIMDNNQTTNEPNH
```

ES 2 327 496 T3

SEQ ID NO: 35 - secuencia de aminoácidos de TolB de *M. catarrhalis*

!!AA_ SECUENCIA 1.0

Traducción de: contig24.txt comprobar: 1253 de: 24097 a: 25356

símbolos generados 1 a: 420.

MCA1c0024

tolB-Mcat.pep Longitud: 420, 22 de diciembre, 1999 09:08 Tipo: P Comprobar: 3135..

```
1  MKSPITKVCL ALTISFSAAL THTYADDELI VISEQVAPSQ YPVAVMPFSE
51 AHQMSHYLSL AGLGTTHQNL PQHTQTNSDI LNNLTAWNR GFHEYIILAQS
101 HQILGNKLAI NYEIIDTANG LSVKHTQIS DNHPASIQAA YRQISDTIYQ
151 IITGQPSDLM GKIAYVEESG SPQNKISLKL LIDPSGQLIR TLDTVNGSII
201 TPTFSPDGLS IAYSVQTKNN LPIIYIVSVS GGTPKLVTPF WGHNLAPSFS
251 PDGSSILFSG SHENNNPNYI RLNLHTNHLD TLTTFNGAEN APNYLADASG
301 FIYTADKGTR RQSLYRYDFG TTHSTQIASY ATNPRLSPDG SKLVYLSGGQ
351 IIIANTKGRI QQSFRVLGTD VSASFSPSGT RIIYTSNQGN KNQLMIRSLS
401 SNAIRTIPTS GTVRDPIWSK
```

(Secuencia pasa a página siguiente)

ES 2 327 496 T3

SEQ ID NO: 36

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de tolA de *M. catarrhalis*

5 Nucleótidos de TolA 27473-28852 en la siguiente secuencia

La secuencia 26451-28900 también es una secuencia de nucleótidos adicional de la invención, en particular la región de 1000 pb secuencia arriba del codón de inicio del gen TolA

10 ! !NA_ SECUENCIA 1.0

MCA1C0028 Longitud: 49617, Tipo: N Comprobar: 3684..

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```
26451 GGC GACTGGC GGATTGTGGA GTATCGCTGT ACTGTGTACT CATTGCACCC
26501 ATGGCATCAA ACATACACGA TTGCGTCCAA TGCTCACTTT CACCGCCGCC
26551 TGCCAGTACG ATATCAGCCT TACCAAGTTG AATCAGCTCC ATGGCATGAC
26601 CGACACAGTG GCTTGAAGTG GCACAGGCAG AAGATAGCGA GTAAGACAAG
26651 CCCTTGATTT TTAGCCCCGT CGCTAAGGCC GCGGATACCG AGCTTGCCAT
26701 GATTTTGGGA ACTGCCATTG CACCTACGCC ACGCAAGCCT TTTTCACGCA
26751 TGGCATCCGC AGCTGCCACC ACATCCGCAG TAGAAGCACC GCCCGATGCT
26801 GCAACCACCG AAACCCTAGG ATTGTCAGTG ATGGTGTCAA TGCTAAGCCC
26851 TGC GTTTTTTG ATTGCTGATA AAGCACTGAT ATATGCATAA AGGCTGGCGT
26901 TGCTCATAAA GCGCTTTAAT TTACGATCAA TGCCTGTGGT GTCCAAGTCA
26951 TCATGATCTA TACTACCTGC CACGCATGAT TTAAATCCCA AATCGGCATA
27001 TTC TTGCTTA AAGCGAATGC CTGAACGCCC ATTTTCTAAG GCCTCCTTGA
27051 CGGTATCTAA ATCATTACCC AAGCAAGAAA CAATGCCTGC ACCTGTGATG
27101 ACAACTCGTT TCATAATTTT ATCCTAAAAA GTTTACAGTT GTAATCTTGC
27151 TATTGTAACA AATTATTCCA ACACTTAGGG AAATTTTCCC AAAATTTTCA
27201 TAAAAATAGG TGAAAATGAC TAAAGATAGA CAAGGGTTTA CCAAATATTT
27251 AGTTATTTCAT CAATTGGCGA CGGTATTTAT GAACATTTAA TAACATTTAT
27301 GTTGTATATT ATCACTAGGC GTAGTTTAGT TTTTGTGATA ATCTTTAGAA
```

ES 2 327 496 T3

27351 GATAATTTTT ATGACAATTT CATACAATTA ATGAGGTTGG ACATACGATA
 27401 GATAAAAGTA AATTGACTTT TTGTATTTTA TGTCAAAACC TGAATCTTAA
 27451 TACCAAAATC ATGGAGTAAC ~~TGATG~~ACAAA ATCAACTCAA AAAACCACCA
 27501 AACAAACACA ACACAGCCAT GATGATCAAG TCAAAGAGCT GGCTCAAGAA
 27551 GTCGCTGAAT ATGATGATGT TGAAATTGTT GCTGAAGTAG ATATCGACAA
 27601 TCAAGCTGTC TCTGATGTTT TGATTATTCG TGATACGGAT ACCAAAGCTG
 27651 ACCAAGCAGA TCACACTGAT GACGCATCTA AAGCAGATGA TGAGACTGTG
 27701 GTAGATGGCG TTAAACAAAA AGCTCAAGAG GCTAAAGAAG ATTTTGAAAA
 27751 TAAAGCACAA GATCTTCAAG ATAAAGCTAC TGAGAAGCTT GAAGTCGCCA
 27801 AAGAAGCTAC CCAAGACAAG GTAGAGAAAA CTCAAAGTTT AGTTGAGGAT
 27851 ATCAAGGATA AAGCCCAATC TTTGCAAGAA GATGCTGCCG ATACAGTTGA
 27901 AGCGTTAAAA CAAGCGGCCA GTGATAAGGT TGAGACTACC AAAGCTGAAG
 27951 CTCAATCACT AAAAGATGAT GCTACTCAA CATTTGAATC AGCCAAACAA
 28001 GCGGTTGAAG GCAAAGTAGA AGCCATCAA GAGCAAGTCT TAGATCAGGT
 28051 TGA~~CT~~CCCTA AAAGACGATA CCGATCAAGA TAATACTGAT CAAGATCAAG
 28101 AAAACAGAC CCTAAAAGAT AAGGCGGTGC AAGCTGCCAC CGCTGCTAAA
 28151 CGCAAAGTTG AAGATGTGGT AGATGATGTC AAACACACCA CCGAATCTTT
 28201 CAAAAATACC GCAAGCGAAA AAATAGATGA GATTAAGCAA GCTGCTGTTG
 28251 AAAAAACAGA AGAGGTCAAA TCTCAGCTTA GCCAAAAGC TGATGCCCTA
 28301 AAATCTTCTG GCGAAGAACT CAAGCAAACA GCTCAAACGG CTGCTAATGA
 28351 TGCCATTACA GAGGCTCAAG CTGCCGTAGT AAGTGGTTCG GTTGCTGCCG
 28401 CTGATTCCGC ACAATCAACC GCTCAAAGTG CAAAAGATAA GCTCAATCAG
 28451 CTCTTTGAAC AAGGTAAGTC CGCTTTGGAT GAAAAAGTTC AAGAATTGGG
 28501 CGAGTAATAT GGTGCAACTG AGAAAATTAA TGCA~~GT~~CAGC GAATATGTAG
 28551 ATCTGGCTAC CCAAGTCATT AAAGAAGAAG CACAAGCACT ACAAACCAAT
 28601 GCCCAAGAAT CTCTACAAGC TGCCAAAGCG GCTGGCGAAG AGTATGACGC
 28651 TACCCACGAA GATAAGGGTT TGACCACTAA ACTTGGTACA GTGGGTGCCT
 28701 ATTTGTCTGG CATGTATGGC ATTAGCCAAA ATAAAAATAA CCATTACCAA
 28751 GGCGTTGACT TGCATCGTGA AAGTTTTGAT AAAGATGCAT TTCATGCCCA
 28801 AAGCAGTTTT TTTGCAGGGA CAAATATTTG GTGCCAAAGC AGTTGCAGCT
 28851 ~~AAGA~~ATGTGG CAGCTAAAGT TGTTCCTCAA TCTAAATTG AAGCCATCGG

ES 2 327 496 T3

SEQ ID NO: 37 - secuencia de aminoácidos de TolA de *Moraxella catarrhalis*

! !AA_ SECUENCIA 1.0

Traducción de: contig28.txt comprobar: 3684 de: 27473 a: 28849

símbolos generados 1 a: 459.

MCA1c0028

tolB-Mcat.pep Longitud: 459, 22 de diciembre, 1999 09:05 Tipo: P Comprobar: 8307..

```
1  MTKSTQKTTK QTQSHDDQV KELAQEVAEY DDVEIVAED IDNQAVSDVL
15  IIRDITDKAD QADHTDDASK ADDETVDVGK KQKAQEAKED FENKAQDLQD
101 KATEKLEVAK EATQDKVEKT QSLVEDIKDK AQSLOEDAAD TVEALKQAAS
20  DKVETTKAEA QSLKDDATQT FESAKQAVEG KVEAIKEQVL DQVDSLKDDT
201 DQDNTDQDQE KQTLKDKAVQ AATAAKRKVE DVVDDVKHTT ESFKNTASEK
25  IDEIKQAAVD KTEEVKSQLS QKADALKSSG EBLKQTAQTA ANDAITEAQA
301 AVVSGSVAAA DSAQSTAQSA KDKLNQLFEQ GKSALDEKVQ ELGE*YGATE
30  KINAVSEYVD LATQVIKERA QALQTNQES LQAAKAAGEE YDATHEDKGL
401 TTKLGTVGAY LSGMYGISQN KNNHYQGVDL HRESFDKDAF HAQSSFFAGT
35  NIWCQSSCS
```

SEQ ID NO: 38

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de OmpCD de *Moraxella catarrhalis*

ADN de Omp CD Mcat

Acceso L10755

```
atgaaatttaataaaatcgctcttgcggatcatcgagccgttgcagctccagttgcagctccagttgct
gtcaagctgg
50  tgtgacagtcagcccactactacttggctatcattacactgacgaagcccacaatgatcaacgcaaaat
cttacgcactg
gcaagaagctagagctagatgctactaatgcacctgcaccagctaattggcgggtgctgcactggacagtg
agctatggact
55  ggtgctgctgattggtatcgaacttacgccatcaactcagttccaagttgaatatggtatctctaaccgt
gatgcaaaatc
ttcagacaaatctgcacatcgctttgatgctgagcaagaaccatcagcggtaactttttgattggtac
tgagcagttca
60  gcggctacaatccaacaaataaattcaagccctatgtcttgggtggtgcaggtcaatctaaaattaaag
taaattgcaattt
gatggttatacagcagaagtagccaatgggcaaaacattgcaaaagatcaagctgtaaaagcaggtcaa
gaagttgctga
65  gtctaaagacaccatcggttaacctaggtcttgggtgctcgctacttagtcaatgatgcccttgcaacttcg
tggtgaagccc
gtgctatccataatttttgataacaaatgggtgggaaggccttggcggttggttggttttagaggtaactttgg
gtggtcggttg
gcacctgcagtagcaccagtagcaccagtgccagaacctgttgctgaaccagttggtgctccagcacctgtg
atccttcctaa
```

ES 2 327 496 T3

accagaacctgagcctgtcattgaggaagcaccagctgtaattgaagatattgttgttgattcagacgg
agatgggtgtgc
ctgatcatctggatgcctgcccaggaactccagtaaactgttgttgatccacgcggttgcccagtac
aggttaatttg
5 gtagaagagcttcgccaagagttgcgtgtattctttgattatgataaatcaatcatcaaaccacaatac
cgtgaagaagt
tgctaagggttgctgcgcaaatgcgtgaattcccaaactgcaactgcaaccattgaaggtcacgcacacg
cgattcagcac
10 gctcaagtgcacgctacaaccagcgtctatctgaagctcgtgctaattgctgttaataatcaatgctatcta
acgaatttggt
atcgctccaaaccgcctaaatgcagttggttatggctttgatcgctcctatcgctccaaatactactgct
gaaggtaaagc
gatgaaccgctcgtgtagaagcagtaatcactggtagcaaaacaacgactgttgatcaaaccaaagatat
gattgttcaat
15 aa

SEQ ID NO: 39

Secuencia de aminoácidos de OmpCD de *Moraxella catarrhalis*

Péptido

MKFNKIALAVIAAVAAPVAAPVAAQAGVTVSPLLLGYHYTDEAHNDQRKILRTGKKLELDATNAPAPAN
GGVALDSELWT
GAAIGIELTPSTQFQVEYGISNRDAKSSDKSAHRFDAEQETISGNFLIGTEQFSGYNPTNKF KP YVLVG
AGQSKI KVNAI
35 DGYTAEVANGQNI AKDQAVKAGQEVAESKDTIGNLGLGARYLVNDALALRGEARAIHNF DNK W W E G L A L
AGLEVTLGGRL
APAVPVAPVAEPVAEPVVAPAPVILPKPEPEPVIEEAPAVIEDIVVDSGDGVPDHLDACPGTFVNTVV
DPRGCPVQVNL
VEELRQELRVFFDYDKSIIKPYREEVAKVAAQMREFPNATATIEGHASRDSARSSARYNQRLSEARAN
AVKSMLSNEFG
40 IAPNRLNAVGYGFDRPIAPNTTAEGKAMNRRVEAVITGSKTTTTVDQTKDMIVQ

(Secuencia pasa a página siguiente)

ES 2 327 496 T3

SEQ ID NO: 40

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de xOmpA de *Moraxella catarrhalis*

5 xompa

! !NA_SECUENCIA 1.0

MCA1C0035

10

mca1c0035.seq Longitud: 2461, 2 de diciembre, 1999 11:22 Tipo: N Comprobar: 9214..

15

1 ATGTGTTTGC ATTGATTGAT AAATACACGC TTAGTCTAGC AGATTTTGG

51 TAAAATGCTT AGCCTTTGTA CGATTTTATG GCTAATTTTA ATAACAAGTG

20

101 AATAAAAACT ACCAACTTTT TGGTAAATTT GATTTTAAGT ATAAGTGGTT

151 CATGTAATTT ATATGCCAAA AAGTATGTGC ATAAAATCAA TCAATGGTT

25

201 TATCTGTCAA TTTGATGAGT GGGTATTGAG GGTTTTTGCT TCATGATTAA

251 AATCATTGAG AATTAATTAC TATCATAATT ACTATAATAT TACAGATATG

30

301 TAAATAAAAA ACCATTCATC ATTTACTTTT GTAATTGCTT AATTTTTTTT

351 GAGCGAATAA AAGGCGGTTT TGTTTATCAA TTGTTGCCAG CGCTTTTAAG

401 TTGCCATAAA ATCAGTCACA ATAGAGTTAT AAAACAAGTG GCTTCAAGCA

35

451 ACTTGTTGTT TTTCTTAAGG ACGGCATCGG CATTTTGCTG ATGGATAATG

40

45

50

55

60

65

ES 2 327 496 T3

501 AAATTTAAAT TTAAATGAC CTATGGAGTG ACTTATGAGC TTAATTAATA
551 AATTAAATGA ACGCATTACG CCGCATGTCT TAACCTCGAT TAAAAATCAA
5 601 GATGGCGATA ATGCTGATAA ATCTAATTTG TTAACCGCAT TTTATACCAT
651 TTTTGCAGGA CGCTTGAGTA ATGAAGATGT GTATCAGCGT GCCAATGCCTT
10 701 TGCCTGATAA TGAGCTTGAG CATGGGCATC ATCTGCTCAA TGTGCTTTT
751 AGTGATGTTT CAACTGGTGA AGATCAGATT GCTTCTTTGA GTAATCAATT
801 AGCCGATGAA TATCATGTTT CGCCAGTAAC GGCACGCACC GCAATCGCAA
15 851 CGGCAGCACC TTTGGCTTTG GCACGCATTA ACATTAAAGA GCAAGCAGGT
901 GTATTGTCTG TACCGTCTTT TATTCGTACT CAATTGGCTA AAGAAGAAAA
951 CCGTTTGCCA ACTTGGGCGC ATACTTTATT GCCAGCAGGG CTATTTGCAA
20 1001 CCGCTGCCAC AACCACCGCC GAGCCTGTAA CGACAGCCTC TGCTGTTGTG
1051 AAAGAGCCTG TCAAACCAAG TGTGTGACA GAACCAGTTC ATCCAGCTGC
1101 GGCTACCACC CCACTCAAAA CACCAACTGC CCGGCATTAC GAAAACAAAG
25 1151 AAAAAAGTCC TTTTCTAAAA ACGATTCTAC CGATTATTGG ATTGATTATT
1201 TTTGCAGGCT TGGCATGGCT TTTGTTAAGA GCATGTCAAG ACAAACCAAC
1251 ACCTGTTGCG GCACCTGTTG CGACAGATAC AGCACCTGTG GTAGCGGATA
30 1301 ATGCTGTACA GGCAGACCCA ACACAAACAG GTGTTGCCCA AGCACCTGCA
1351 ACGCTTAGCT TGTCTGTTGA TGAAACGGGT CAAGCGTTGT ACTCGCACCG
35 1401 TGCTCAGGTT GGTAGTGAAG AGCTTGCAGG TCATATCCGT GCAGCTATTG
1451 CTCAAGTCTT TGGCGTACAA GATTTAACCA TTCAAAATAC CAATGTÀCAT
1501 ACCGCTACGA TGCCAGCGGC AGAATACTTA CCAGCAATTT TGGGTTTGAT
40 1551 GAAAGGTGTA CCAAATTCAA GCGTTGTGAT TCATGATCAT ACGGTACGCT
1601 TTAATGCAAC CACGCCAGAA GATGTAGCAA AACTGGTAGA GGGTGCTAAA
1651 AATATTCTAC CCGCTGATT TACTGTAGAA GCAGAACCTG AACTTGATAT
45 1701 TAATACTGCG GTTGCCGATA GTATTGAAAC AGCGCGTGT GCTATTGTTG
1751 CTTTGGGTGA TACGGTTGAA GAAAATGAGA TGGATATTTT AATCAATGCA
1801 TTAAATACCC AAATCATTAA CTTTGCTTTA GACTCAACCG AAATCCCCA
50 1851 AGAAAATAAA GAAATCTTGG ATTTGGCTGC CGAAAAATTA AAGGCAGTGC
1901 CTGAAACAAC TTTGCGTATC ATTTGGTCATA CAGACACTCA AGGCACGCAT
1951 GAGTATAATC AAGATTTATC AGAATCTCGT GCTGCTGCTG TTAAAGAGTA
55 2001 TTTGGTATCA AAAGGTGTTG CTGCTGAACG TTTGAACACT CAAGGTGCAA
2051 GTTTTGATTA TCCAGTTGCA TCAAATGCTA CCGAACCAAG TCGCTTCCAA
60 2101 AACCGTCGTA TTGAGTTTGT ACTTTTCCAA GAAGGTGAAG CAATTACTCA

65

ES 2 327 496 T3

2151 AGTCGGTCAT GCTGAAGATG CACCAACACC TGTTGCACAA AACTGATCAT
 2201 TTTGTTATTG GTTATGAGTT TTAGATTGGG CCAAATGAAT GATAATATAC
 2251 CAATCTTACA AGTACTTTTA ATAACCAAAA CCAACCGTAA TCAACCCAAG
 2301 AACCAAATTA CCCATCGGTC ATTTGGTTCT TGGGTAGTTT TTATTGGCTC
 2351 TCAATATATG ATGTAGACCA ATTTGACCCA AAATAGATCA GAGTTTGGGT
 2401 CTTGGATTTG CGACCATATC GTATAACTGA CATATCTTGA ACACAAAAAA
 2451 GCATAAAATG A

SEQ ID NO: 41

Secuencia de aminoácidos de xOmpA de *Moraxella catarrhalis*, y también mostrada en la figura 2
 xompa

!!AA_ SECUENCIA 1.0

Traducción de: omp854.seq comprobar: 9214 de: 1 a: 2461

símbolos generados 1 a: 820.

MCA1C0035

omp854.pep Longitud: 553, 2 de diciembre, 1999 11:35 Tipo: P Comprobar: 5451..

1 MSLINKLINER ITPHVLTSIK NQDGDNADKS NLLTAFYTIF AGRLSNEDVY
 51 QRANALPDNE LEHGHLLNV AFSDVSTGED QIASLSNQLA DEYHVSPVTA
 101 RTAIATAAPL ALARINIKEQ AGVLSVPSFI RTQLAKEENR LPTWAHTLLP
 151 AGLFATAATT TAEPVTTASA VVKEPVKPSV VTEPVHPAAA TTPVKTPPTAR
 201 HYENKEKSPF LKTILPIIGL IIFAGLAWLL LRACQDKPTP VAAPVATDTA
 251 PVVADNAVQA DPTQTGVAQA PATLSLSVDE TGQALYSHRA QVGSEELAGH
 301 IRAAIAQVFG VQDLTIQNTN VHTATMPAAE YLPAILGLMK GVPNSSVVIH
 351 DHTVRFNATT PEDVAKLVEG AKNILPADFT VEAPELDIN TAVADSIETA
 401 RVAIVALGDT VEENEMDILI NALNTQIINF ALDSTEIPQE NKEILDIAAE
 451 KLVAVPETTL RIIGHTDTQG THEYNQDLSE SRAAAVKEYL VSKGVAAERL
 501 NTQGASFDYP VASNATEQGR FQNRRIEFVL FQEGEAITQV GHAEDAPTPV
 551 AQN

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 42

Secuencia de nucleótidos de la región codificante de tipo P6 (o PAL-1) de *Moraxella catarrhalis*

5 ADN (tipo P6) Pal mcat

10 ATGATGTTACATATTCAAATTGCCGCCGCTGCCGCCGCTTTATCGGTACTAACTTTTATG
ACAGGCTGTGCCAATAAATCAACAAGTCAAGTTATGGTTGCTCCTAATGCACCCACAGGT
TACACTGGGGTTATCTATACTGGTGTGCACCTTTGGTAGATAATGATGAGACCGTTAAG
15 GCTCTGGCAAGCAAGCTACCCAGTTTGGTTTATTTTGAAGTTTCTGATGAGATTAAA
CCGCAAGCTGCTGCCATCTTAGACGAACAAGCACAATTTTAAACCACCAATCAAACAGCT
CGTGTTTTGGTTGCAGGTCATACCGATGAGCGTGGTAGTCGTGAGTATAATATGTCAGTG
GGGGAACGCCGTGCCGTGGCGGTACGCAACTATTTGCTTGGTAAAGGCATTAATCAAGCC
20 AGCGTTGAGATTATCAGTTTTGGTGAAGAACGCCCTATCGCATTTGGCACAAATGAAGAA
GCATGGTCACAAAATCGTCGTGCTGAAGTGTCTTATTAA

25 SEQ. ID NO: 43

Secuencia de aminoácidos de tipo P6 (o PAL-1) de *Moraxella catarrhalis*

30 Péptido (tipo P6) Pal Mcat

35 MMLHIQIAAAAAAĹSVĹTFMTGCANKSTSQVMVAPNAPTGYTGVIYTGVAPLVDNDETVK
ALASKLPSLVYFDFDSDEIKPQAAAILDEQAQFLTTNQTARVLVAGHTDERGSREYNMSL
GERRAVAVRNYLLGKGINQASVEIISFGEERPIAFGTNEEAWSONRRAELSY

40

(Secuencia pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 44

Secuencia de nucleótidos de la región codificante PAL-2 de *Moraxella catarrhalis*

! !NA_SECUENCIA 1.0

Definición: MCat Lipo4 2ª lipoproteína tipo Pal BASB113 SBBMCA012

Acceso: BASB113

Lipo4_MCat.seq Longitud: 675 28 de abril, 1999 09:31 Tipo: N Comprobar:

LIPO04_MCAT Longitud: 675 7 de febrero, 2001 17:42 Tipo: N Comprobar: 4424..

```

1  ATGAAAATTA AAGCATTGGG TGTGTGCTG TTGGCATCAA GTATGGCTTT
51  GGCAGGTTGT GCAAATACAG GCACAACTGG CAATGGCACA GGATTTGGTG
101 GTGCTAATGT CAATAAGGCG GTGATTGGGG CTGTGGCAGG TGCACCTGGC
151 GGTACTGCCA TTTCAAAAGC AACTGGTGGC GAAAAAACAG GTCGTGATGC
201 CATTTTGGGG GCGGCAGTTG GTGCAGCAGC AGGGGCGTAT ATGGAGCGTC
251 AAGCAAAGCA GATTGAGCAA CAAATGCAAG GAACGGGCGT GACTGTAACC
301 CACGATACCG ACACGGGTAA TATTAATCTA ACTATGCCAG GTAATATTAC
351 TTTTGCTCAT GATGACGATA CTTTAAACAG TGCATTTTTG GGTCGTTTAA
401 ACCAGCTGGC TAATACGATG AATCAGTATC ATGAAACAAC GATTGTCATT
451 GTAGGACATA CAGACTCAAC GGGTCAAGCG GCTTATAATC AAGAGCTGTC
501 TGAGCGTCGA GCGGATTCAG TCGTTATTA CTTGATTAAAT CAAGGCGTTG
551 ATCCATATCG TATTCAGACA GTGGGGTATG GTATGCGACA ACCGATTGCA
601 TCGAATGCAA CCGAAGCAGG TCGTGCTCAA AATCGCCGTG TTGAGCTGAT
651 GATTTTAGCA CCGCAGGGTA TGTA

```

(Secuencia pasa a página siguiente)

ES 2 327 496 T3

SEQ. ID NO: 45

Secuencia de aminoácidos de PAL-2 de *Moraxella catarrhalis*. Véase la figura 2.

Pal2

! !AA_SECUENCIA 1.0

Definición: MCat Lipo4 2^a lipoproteína tipo Pal BASB113 SBBMCA012

Acceso: BASB113

Lipo4_MCat.pep Longitud: 224 28 de abril, 1999 09:21 Tipo: P Comprobar:

LIPO04_MCAT Longitud: 224 20 de diciembre, 1999 12:28 Tipo: P Comprobar: 4279..

```
1  MKIKALGVVL  LASSMALAGC  ANTGTTGNGT  GFGGANVNKA  VIGAVAGALG
51  GTAISKATGG  EKTGRDAILG  AAVGAAAGAY  MERQAKQIEQ  QMQGTGVTVT
101 HDTDGTGNINL  TMPGNITFAH  DDDTLNSAFL  GRLNQLANTM  NQYHETTIVI
151 VGHTDSTGQA  AYNQELSERR  ADSVRYYLIN  QGVDPYRIQT  VGYGMRQPIA
201 SNATEAGRAQ  NRRVELMILA  PQGM
```

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas que se ha modificado genéticamente por reducción de la expresión de uno o más genes *Tol*.
2. La bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas de la reivindicación 1, en la que la bacteria se ha modificado genéticamente atenuando la actividad de unión a péptidoglucanos por mutación de uno o más genes que codifican una proteína que comprende un sitio asociado a péptidoglucanos.
3. La bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas de la reivindicación 1 ó 2, que se ha modificado genéticamente por reducción de la expresión de uno o los dos genes seleccionados de un grupo que consiste en *exbB* (*tolQ*) y *exbD* (*tolR*).
4. La bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas de las reivindicaciones 1-3, que se ha modificado genéticamente por mutación de *rmpM* para atenuar la actividad de unión a péptidoglucanos de la proteína codificada.
5. La bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas de las reivindicaciones 1-4, que se ha diseñado además genéticamente mediante uno o más procedimientos seleccionados del siguiente grupo: (a) un procedimiento de reducción de la expresión de antígenos inmunodominantes variables o no protectores, (b) un procedimiento de aumento de la expresión de antígenos OMP protectores, (c) un procedimiento de reducción de la expresión de un gen implicado en hacer tóxica la parte de lípido A del LPS, (d) un procedimiento de aumento de la expresión de un gen implicado en hacer menos tóxica la parte de lípido A del LPS, y (e) un procedimiento de diseño de la cepa bacteriana para la producción de vesículas de modo que esté desprovista de polisacárido capsular.
6. Una vacuna que comprende la bacteria definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal.
8. Un uso de una cantidad eficaz de la bacteria definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la fabricación de un medicamento para proteger a un individuo frente a una infección bacteriana.
9. Un procedimiento para preparar una composición de vacuna que comprende una preparación de vesículas de membrana, cuyo procedimiento comprende: (a) inocular un recipiente de cultivo que contiene la bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un medio nutriente adecuado para hacer crecer dicha bacteria; (b) cultivar dicha bacteria; (c) recuperar las vesículas de membrana del medio; y (d) mezclar dichas vesículas de membrana con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, que además comprende una etapa después de la etapa (c) o etapa (d), cuya etapa comprende esterilizar por filtración la preparación de las vesículas de membrana.
11. Un procedimiento para producir una bacteria *Neisseria meningitidis* formadora de hipervesículas de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, cuyo procedimiento comprende modificar genéticamente la cepa bacteriana diseñando la cepa para reducir la expresión de uno o más genes *Tol*.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, que además comprende la etapa de atenuar la actividad de unión a péptidoglucanos por mutación de uno o más genes que codifican una proteína que comprende un sitio asociado a péptidoglucanos.

Figura 1. Alineamiento múltiple de proteínas asociadas a péptidoglucanos

		*	20	*	40	*	
OMPA_EC	:	-MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNTWYTGA	KLGSQYHD--	TGFINNNGP-THE	:	53	
P5_HI	:	-MKKTAIALVVAGLAAASVAQAAPQENTFYAGVKAGQAS	FHDGLRALAREYKVGYHR	:	56		
RMP_NM	:	-----	-----	-----	:	-	
PIII_NG	:	-----	-----	-----	:	-	
PAL_EC	:	-----	-----	-----	:	-	
P6_HI	:	-----	-----	-----	:	-	
PCP_HI	:	-----	-----	-----	:	-	
LPP_EC	:	-----	-----	-----	:	-	
		60	*	80	*	100	*
OMPA_EC	:	NQLGAGAPGGYQV----	NPYVGFEMGYDWLGRMPYKGSVENG----	AYKAQGVQLTA	:	102	
P5_HI	:	NSFTYGVFGGYQILNQNNLGLAVELGYDDFGRAGR--	EKGKTVVKHTNHGTHLSL	:	110		
RMP_NM	:	-----	-----	-----	M	:	1
PIII_NG	:	-----	-----	-----	M	:	1
PAL_EC	:	-----	-----	-----	-----	:	-
P6_HI	:	-----	-----	-----	-----	:	-
PCP_HI	:	-----	-----	-----	-----	:	-
LPP_EC	:	-----	-----	-----	-----	:	-
		120	*	140	*	160	*
OMPA_EC	:	KLGYPIITDDLDIYTRLGGMVWRADTKSN-----	VYGKNHDTGVSPVFAGGVEYA	:	151		
P5_HI	:	KGSYEVLEGLDVYGKAGVALVRSYKLYNENSSTLKKLGEHHRARASGLFAVGAEYA	:	167			
RMP_NM	:	TKQLKLSALFVALLASGTAVAGEASVQG-----	YT-VSGQ	:	35		
PIII_NG	:	TKQLKLSALFVALLASGTAVAGEASVQG-----	YT-VSGQ	:	35		
PAL_EC	:	-----	-----	MQLNK	:	5	
P6_HI	:	-----	-----	MNK	:	3	
PCP_HI	:	-----	-----	MKK	:	3	
LPP_EC	:	-----	-----	-----	:	-	
		180	*	200	*	220	
OMPA_EC	:	ITPEIATRLEYQWTNNIGDAH-----	TIGTRPDNGMLSLGVS YRFGQGEAAPVV	:	200		
P5_HI	:	VLPELAVRLEYQWLTRVGKYRPQDKPNT-ALNYPNPGWISINIGISYRFGQGEAAPVV	:	222			
RMP_NM	:	SNEIVRNNGECWKNAYFDKA-----	SQGRVECGDAVAPPEPEPEPEPAPVVV	:	84		
PIII_NG	:	SNEIVRNNGECWKNAYFDKA-----	SQGRVECGDAVAVPE----	PEPAPVAVV	:	80	
PAL_EC	:	VLKGLMIALPVMAIAACSSNK-----	NASNDGSEGMLGCTGMDANGANGNMSS	:	54		
P6_HI	:	FVKSLLVAGSVAALAACSSS-----	N-ND-----	AGNGAAQTFG-GYSVA	:	42	
PCP_HI	:	TNMAALLVAFS-VTGCANTD-----	IFSGDVYSASQKEARSITYETIVSYR	:	50		
LPP_EC	:	-----	-----	-----	:	-	
						v	
		*	240	*	260	*	280
OMPA_EC	:	APAPAPAPEVQTKHFTKSDALNNENKATLKPEGQAALQLYSQHSNLDPKDGSVVV	:	257			
P5_HI	:	A-----APEVVSKTFSSNSDITSPKCKANLKPQAQATLESYIGEMSQV--	KSARKAN	:	272		
RMP_NM	:	EQ----APQYVDETISASAKTLFSDKDSLRAEAQDNKVLAAQRFGQT--	NIQSVRV	:	135		
PIII_NG	:	EQ----APQYVDETISASAKTLFSDKDSLRAEAQDNKVLAAQRFSRT--	NVQSVRV	:	131		
PAL_EC	:	EE----QARLQMQLQONNIYEDLDNYDIRSDFAQMLAHANFIRSN--	PSYKVTV	:	105		
P6_HI	:	D-----LQQR-----	YNTYVSELDKYDITGEYVQILSAHAAYENAT--	PAAKVLY	:	85	
PCP_HI	:	PVK--IQADNQG VVGTEGGGALGFIAGSTIGGGRGQAIAAVVGAIGGA--	IAGSKIE	:	103		
LPP_EC	:	-----MKATKLVLAGAFILST-LLAGCSSNAKIQSSSDVQTL--	NAKVDQL	:	44		

Sitio de asociación de péptidoglucanos

	*	300	*	320	*	340	
OMPA_EC :		LCYDDRIGSDAFNQGLSEERRAQSVDYHISRGIPADKREARMGESNPVTGNTCD--					: 312
P5_HI :		ACYDDRIGSDAFNVKLISQERADSVANYFVAGVADATATYKCANPVTGATCD--					: 327
RMP_NM :		ECHIDFMCEDKNQALSEERAYVANNVSNCPVSRRAHGLGESQAQMTQVCEAE					: 192
PIII_NG :		ECHIDFMCEKKNQALSEERAYVANNVSNCPVSRRAHGLGESQAQMTQVCOAE					: 188
PAL_EC :		SGHADERGTPEYNISIGERRANAWKMYDQCKGSSDQSI SYEKEKPAVLGHDE--					: 160
P6_HI :		SGHADERGTPEYNIALGRRPADAKGYLACKGIDGKLGTSYEEKPAVLGHDE--					: 140
PCP_HI :		SKMSQVNCALVLVKKODGQETVVVOKADSSFCSLVAEFVFPREGSSSLNVSVL----					: 155
LPP_EC :		SNDVNAMRPDVQAAKDDAARAWORLDNMATSYRK-----					: 78

	*	360	*	380	*	
OMPA_EC :		-----NVKQRAALIDCLAPDRPVEIEVKGIKDVVTQPQA-----				: 346
P5_HI :		-----QVKGKRALICFAPDRPVEIAVNGIK-----				: 353
RMP_NM :		VAKLGAKVSKAKKREALICIEPDRPDVKIRSIIVTRQVVPARNHHQH				: 240
PIII_NG :		VAKLGAKASKAKKREALICIEPDRPDVKIRSIIVTRQVVPARNHHQH				: 236
PAL_EC :		-----AYSKNREAVLVY-----				: 173
P6_HI :		-----AYSKNREAVLAY-----				: 153
PCP_HI :		-----				: -
LPP_EC :		-----				: -

Figura 2. Alineamiento múltiple de proteínas asociadas a péptidoglucanos

		*	20	*	40	*	
RMP_NM	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PIII_NG	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPA_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL1_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
XOMPA_MC	:	MSLINKLNERITPHVLT	SIKNQDGDNADKSNLL	TAFYTI	FAGRLSNEDVYQRANAL		56
PAL2_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPCD_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
		60	*	80	*	100	*
RMP_NM	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PIII_NG	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPA_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL1_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
XOMPA_MC	:	PDNELEHGHLLNVA	FSVDSTGEDQIASLS	NQLADEYHVS	PVTARTAIATAAPLAL		112
PAL2_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPCD_MC	:	-----	-----	-----	-----	MKFNKIALAVIAAV	14
		120	*	140	*	160	
RMP_NM	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PIII_NG	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPA_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL1_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
XOMPA_MC	:	ARINIK	EQAGVLSVPSFIR	TQLAKEENR	LPTWAHTLLPAGL	FATAATTTAE	PVTTA 168
PAL2_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPCD_MC	:	AAPVAAPVAAQAG	VTVSPLLLGYHYT	DEAHNDQRKI	LRTGKKLELDAT	NAPAPANG	70
		*	180	*	200	*	220
RMP_NM	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PIII_NG	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPA_EC	:	-----	-----	-----	-----	MKKT	ATAIAVALAGFAT 17
PAL_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL1_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
XOMPA_MC	:	SAVVK	EPVKPSVVT	EPVHPAAAT	TPVKIPTARHY	ENKEKSPFL	KTILPIIGLIIFA 224
PAL2_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPCD_MC	:	GVALD	SELWTGAAIG--	IELTPSTQ	FQVEYGISNR	DAKSSDKS	AHRFDAQETISG 124
		*	240	*	260	*	280
RMP_NM	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PIII_NG	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPA_EC	:	VAQAAP	KDNTWYTGAK	LGWSQYHDT	GFINNNGP	THENQLG	AGAFGGYQVNPYVGFE 73
PAL_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL1_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
XOMPA_MC	:	GLAWL	LLLRACQDK	PTPVAA	PVATDTAP	VVADNAVQ	ADPTQTGVAQAPATLSLSVDE 280
PAL2_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPCD_MC	:	NFLIG	TEQFSGYN	PTNKF	KPYVLV	GAGQSKI	KVNAIDGYTAEVANGQNIAKDQAVK 180
		*	300	*	320	*	
RMP_NM	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PIII_NG	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPA_EC	:	MGYDW	LGRMPYKGS	VENGAYKA	QGVQLTAK	LGYPITD	DLDIYTRLGGMVWRADTK 129
PAL_EC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
PAL1_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
XOMPA_MC	:	TGQAL	YSHRAQVG	SEELAGH	IRAAIAQ	VFGVQDL	TIQNTNVHTATMPAAEYLPAIL 336
PAL2_MC	:	-----	-----	-----	-----	-----	-
OMPCD_MC	:	AGQ	EVAESKDT	IGNLGL	GARYLVN	DALALR	GEARAIHNFNKNWEG-LALAGLEV 235

ES 2 327 496 T3

```

      340          *          360          *          380          *
RMP_NM   : AVAGEASVQRYT-----MSGQSNEIRNNYGECKWNAFYDKASQGRVECGDAVAA : 69
PIII_NG  : AVAGEASVQRYT-----MSGQSNEIRNNYGECKWNAFYDKASQGRVECGDAVAV : 69
OMPA_EC  : NYGKNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPDNGMLSL : 185
PAL_EC   : -MQLNKVLKGLM-----GA---LPVMAIAACSSNKNASNDGSEGMLGAGTGMDAN : 46
PAL1_MC  : -MMLHIQIAAAA-----AALSVLTFMTGCANKSTSQVMVAPNAPTGYTGV : 44
XOMPA_MC : GIMKGVPNSSVVIHDTVRFNATTPEDVAKLVEGAKNILPADFTVEAEPELDINTA : 392
PAL2_MC  : GTTGNGTGFGANVN-KAIGAVAGAGGTAISKATGGEKTGRDAILGAAVGAAAG : 78
OMPCD_MC : LGGRLAPAVPVAPVAEPVAEPVVAPAPVILPKPEPEPVIEEAPAVIEDIVVDSGD : 291

```

```

      400          *          420          *          440
RMP_NM   : PEPE--PEPEPAVVEQAPQYVDIT---SLSAKTLFGDNDSLRAEAQDNL : 118
PIII_NG  : PE-----PEPAVAVVEQAPQYVDIT---SLSAKTLFGDNDSLRAEAQDNL : 114
OMPA_EC  : GVSYRFGQGEAAVEAPAPAPAPEVETKHF---TLKSDVLFENKATLPEGQAAL : 238
PAL_EC   : GG-----NG---NMSSEQARLQMQ---QONNIWYEDLDYDIRSDFAQML : 88
PAL1_MC  : IY-----TGVAEDNDDETVMKALASK-----LPS-LWYEDDSDDEIRPAAAIL : 87
XOMPA_MC : VADS--IETARVAHALGDTVEENEMDILINA-LNTQILNFALDSTEIPOENKEIL : 445
PAL2_MC  : AYMERQAKQIEQQOGTGVTVTHDITDGNINL-TMPGNITEAHDDTINS AFLGRIL : 133
OMPCD_MC : GVPDHLDACPGTPVNTVVDPRGCPVQVNLVEELRQELRVFFDYDKSIKPYREEV : 347

```

↑

Sitio de asociación de péptidoglucanos

```

      *          460          *          480          *          500
RMP_NM   : KVEQQRLEGQTN--IQSVRVECHTDF---MGSEKYNQALSEPPAYVYVANNLV-SNGV : 168
PIII_NG  : KVEQQRLESRTN--VQSVRVECHTDF---MGSEKYNQALSEPPAYVYVANNLV-SNGV : 164
OMPA_EC  : EQYISQSNLDPKDGSVVVLGYTDR---IGSDAYNQLSERRAQSVVDYLL-SRGI : 290
PAL_EC   : GAHNFILRSNP--SYKVTVECHADE---RGTPENISLGERRANAVGMLQ-GHGV : 138
PAL1_MC  : DEQVQFLTTNQ--TARVLVAGHTDE---RGSREYNMSLGERRAVAVNNLL-GHGI : 137
XOMPA_MC : ILAEKELKAVP--ETTLRIICHTDT---QGTHEYNDLSESRAAVEEELV-SHGV : 495
PAL2_MC  : NOENININQYH--ETTLVIVGHTDS---TGOAAYNQLSERRADSVYELI-NGGV : 183
OMPCD_MC : AKVAAQMRFP--NATATIEGHASRDSARSARYNQLSEARANAVSMLSNEIGH : 401

```

```

      *          520          *          540          *          560
RMP_NM   : PVSRIISAVGLGESQAQMTQVCAEVAKLGAQVSKAKKEALACIEPDRRVDVKIR : 224
PIII_NG  : PASRIISAVGLGESQAQMTQVCAEVAKLGAQVSKAKKEALACIEPDRRVDVKIR : 220
OMPA_EC  : PADKISAREMGESNPTGTNTCDN-----VKQRAALIDCLAPDRRVEIEVK : 335
PAL_EC   : SADQISISYKKEKPAVLGHDEAAYS-----KERRAVLVY----- : 173
PAL1_MC  : NQASVEILSFGEERPAFGTNEAWS-----QERRAEISY----- : 172
XOMPA_MC : AAEIRINTQCAFDPYASNATEQGR-----FQNRRIEFVLFQEGEAITQVGH : 543
PAL2_MC  : DPYRIQTVCYEMRQEPASNATEAGRA-----QNRVVELILAPQGM----- : 224
OMPCD_MC : APNRLNAVGYGDRPEAPNTTAEKGA-----MNRVEAVITGSKTTTVDQTKD : 449

```

```

      *
RMP_NM   : SIVTRQVVPAAHNNHQH : 240
PIII_NG  : SIVTRQVVPARNHHQH : 236
OMPA_EC  : GIKDVVTQPQA----- : 346
PAL_EC   : ----- : -
PAL1_MC  : ----- : -
XOMPA_MC : EDAPTPVAQN----- : 553
PAL2_MC  : ----- : -
OMPCD_MC : MIVQ----- : 453

```

Figura 3. Estructura hipotética de ompCD de *M. catarrhalis*

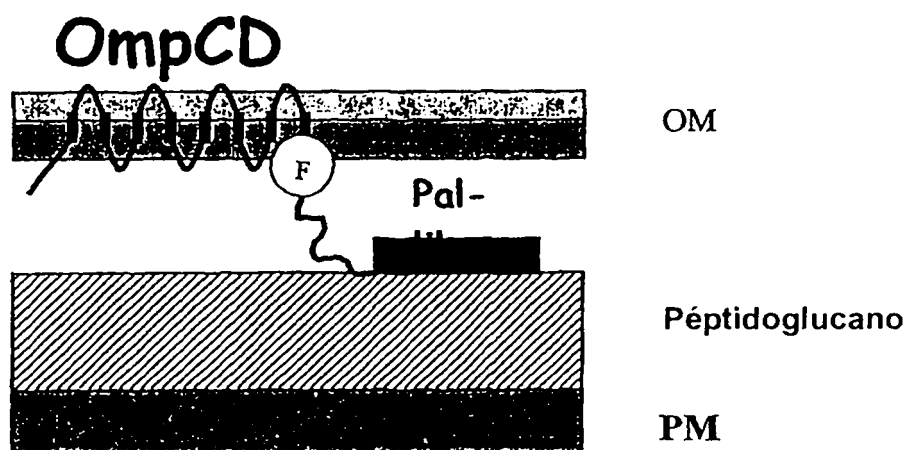
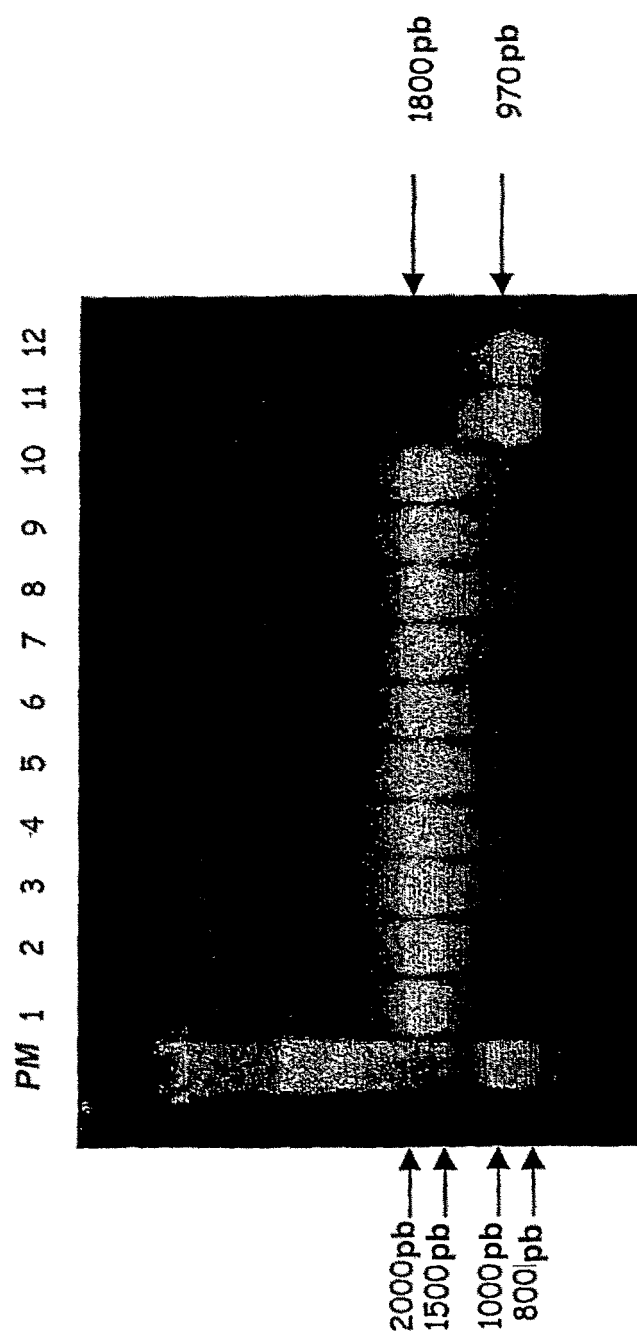


Figura 4: Cribado por PCR de *Neisseria* recombinante que resulta de un sobrecruzamiento doble en el sitio de rmp



1 a 10: *Neisseria* rmp recombinante
11 y 12: *Neisseria* salvaje control

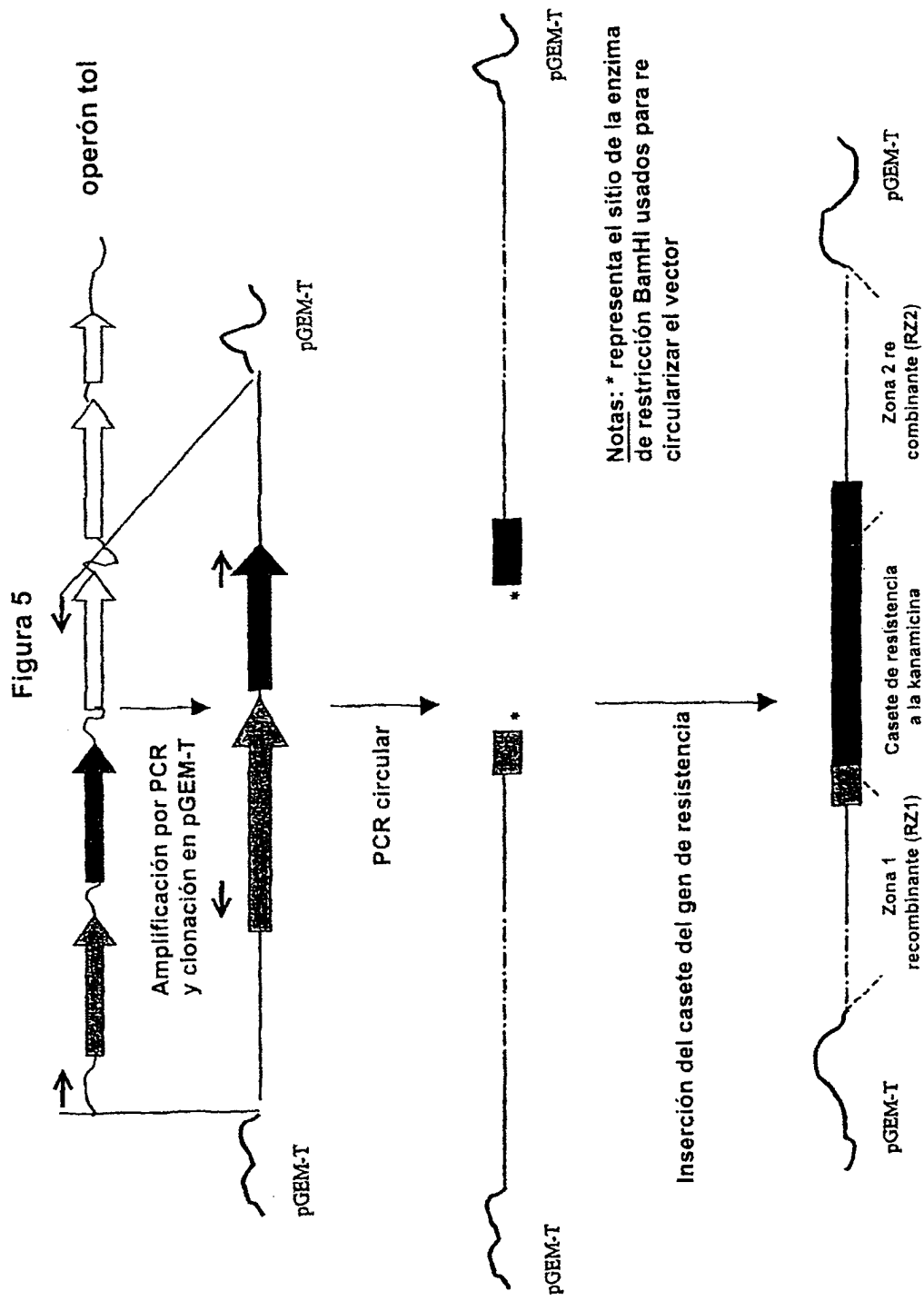


Figura 6

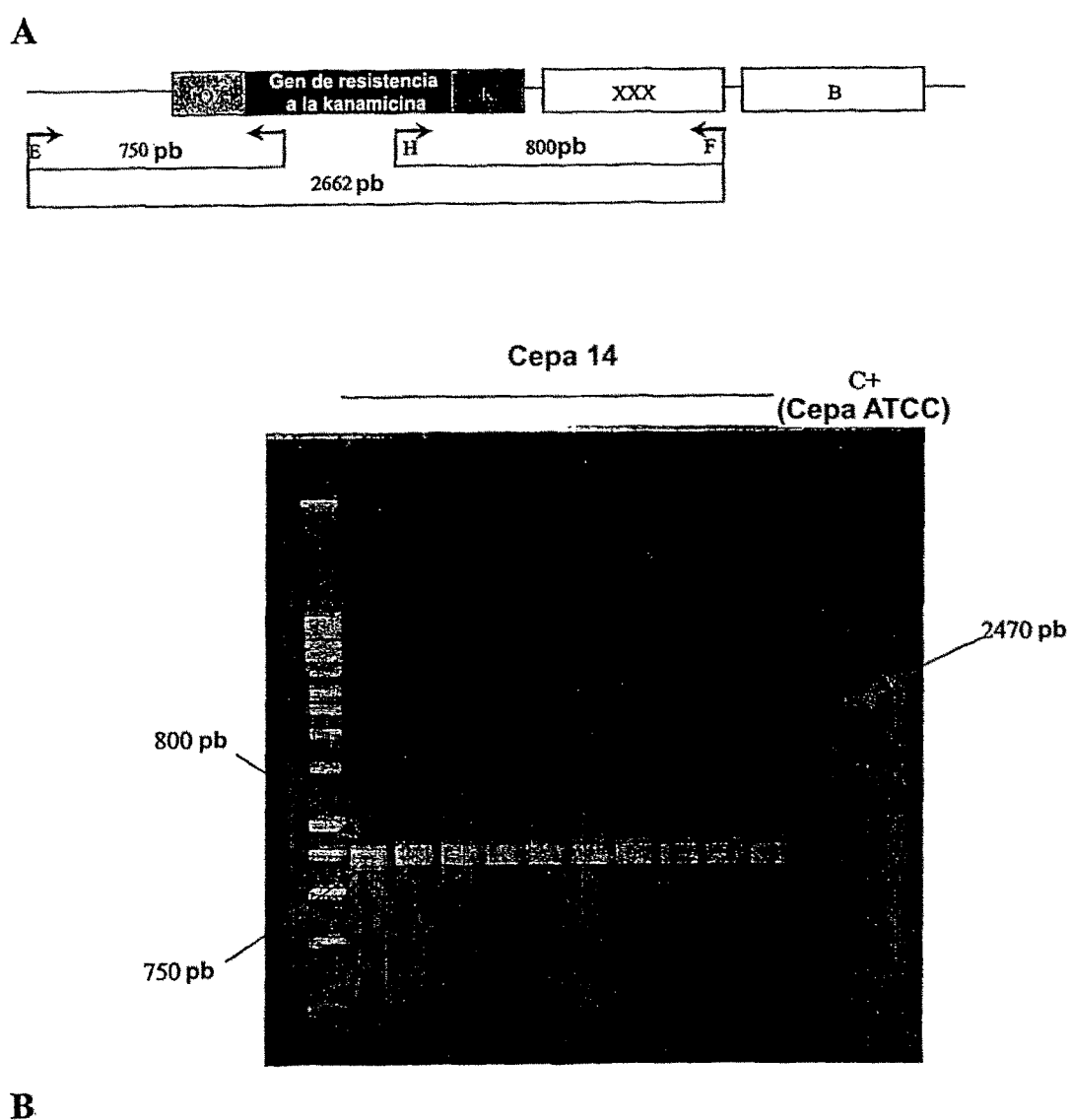


Figura 7

