

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **31.07.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.08.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9918319**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.05.2002**
(Věstník č. 5/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/07424**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/09350**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 403

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/74	A 61 K 39/09
C 12 N 15/31	A 61 K 39/104
C 12 N 15/67	A 61 K 39/102
C 12 N 1/21	A 61 K 39/295
A 61 K 39/02	C 07 K 14/195
A 61 K 39/095	
A 61 K 39/116	
A 61 K 39/118	

(71) Přihlašovatel:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
Rixensart, BE;

(72) Původce:

Berthet Francois-Xavier Jacques, Rixensart, BE;
Dalemans Wilfried L. J., Rixensart, BE;
Denoel Philippe, Rixensart, BE;
Dequesne Guy, Rixensart, BE;
Feron Christiane, Rixensart, BE;
Lobet Yves, Rixensart, BE;
Poolman Jan, Rixensart, BE;
Thiry Georges, Rixensart, BE;
Thonnard Joelle, Rixensart, BE;
Voet Pierre, Rixensart, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcína

(57) Anotace:

Imunoprotektivní a netoxické vakcíny založené na váčcích gramnegativních bakterií, vhodné pro pediatrické použití. Příklady gramnegativních kmenů, ze kterých se váčky připravují, jsou *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* a *H. influenzae*. Váčky podle vynálezu jsou zlepšeny jednou nebo více genetickými změnami chromosomu bakterie včetně regulace ke zvýšení exprese ochranných antigenů, regulace ke snížení exprese imunodominantních neprotektivních antigenů a detoxifikace části lipidu A LPS.

Vakcína

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká vakcín proti gramnegativním bakteriím, způsobu jejich výroby a jejich použití v lékařství. Vynález se zvláště týká nových vakcín založených na váčcích vnější membrány (neboli blebs) a výhodných způsobů přeměny těchto vakcín do účinnější a bezpečnější formy.

Dosavadní stav techniky

Gramnegativní bakterie jsou od vnějšího prostředí odděleny dvěma za sebou následujícími vrstvami membránových struktur. Tyto struktury, které se označují jako cytoplasmatická membrána a vnější membrána (OM, outer membrane) se liší jak svou strukturou, tak svou funkcí. Vnější membrána má důležitou úlohu při interakci patogenních bakterií s případnými hostiteli. Z toho vyplývá, že bakteriální molekuly vystavené (exponované) na povrchu představují důležité cíle pro imunitní odpověď hostitele, což způsobuje vhodnost složek vnější membrány jako kandidátů při poskytování vakcín, diagnostických a terapeutických prostředků.

Vakcíny založené na celých buňkách (usmrcených nebo oslabených) mají výhodu v tom, že poskytují větší počet antigenů v jejich přirozeném mikroprostředí. Nevýhody spočívají ve vedlejších účincích indukovaných bakteriálními složkami, jako jsou endotoxiny a fragmenty peptidoglykanů. Na druhé straně, bezbuněčné podjednotkové vakcíny obsahující vyčištěné složky vnější membrány, mohou poskytnout pouze omezenou ochranu a nemusí antigeny vhodným způsobem předkládat imunitnímu systému hostitele.

Proteiny, fosfolipidy a lipopolysacharidy jsou tří hlavní složky, které se nacházejí ve vnější membráně všech gramnegativních bakterií. Tyto molekuly jsou distribuovány asymetricky: membránové fosfolipidy (většinou ve vnitřním povrchu), lipopolysacharidy (výlučně ve vnějším povrchu) a proteiny (lipoproteiny vnitřního a vnějšího povrchu, integrální nebo polytopické membránové proteiny). U mnoha bakteriálních patogenů s dopadem na lidské zdraví bylo zjištěno, že lipopolysacharidy a proteiny vnější membrány jsou imunogenní a mohou poskytovat ochranu proti odpovídajícímu onemocnění prostřednictvím imunizace.

Vnější membrána gramnegativních bakterií představuje dynamický systém a v závislosti na podmínkách vnějšího prostředí může podléhat drastickým morfologickým přeměnám. Mezi těmito projevy byla studována a dokumentována u mnoha gramnegativních bakterií tvorba váčků nebo puchýřků („blebs“) vnější membrány (Zhou, L. a další, 1998, FEMS Microbiol. Lett. 163: 223 - 228). Nevyčerpávající seznam bakterií patogenů, u kterých byla tvorba takových váčků hlášena, zahrnuje: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Yersinia enterocolitica*. I když biochemický mechanismus odpovědný za tvorbu váčků vnější membrány není dosud zcela jasný, tyto váčky vnější membrány byly intenzivně studovány, protože představují účinnou metodologii pro izolaci proteinových preparátů vnější membrány ve svých nativních konformacích. V této souvislosti je využití preparátů založených na vnější membráně zvláště zajímavé pro vývoj vakcín proti bakteriím *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Chlamydia*. Navíc kombinují váčky vnější membrány větší počet proteinových a neproteinových antigenů,

u kterých je pravděpodobné, že poskytnou zvýšenou ochranu proti mezidruhovým variantám.

Ve srovnání s jinými, více používanými typy bakteriálních vakcín (vakcíny založené na úplných bakteriálních buňkách a čištěné podjednotkové vakcíny) autoři vynálezu ukázali, že vakcíny založené na membránových váčcích (při určitém způsobu modifikace) mohou představovat ideální kompromis.

Široké použití bakteriálních podjednotkových vakcín bylo způsobeno intenzivním studiem proteinů bakteriálního povrchu, u kterých bylo zjištěno, že jsou využitelné ve vakcínách (například pertaktin *B. pertussis*). Tyto proteiny jsou volně asociované s vnější bakteriální membránou a mohou být čištěny z kultivačního supernatantu nebo snadno extrahovány z bakteriálních buněk. Bylo však také ukázáno, že ochranné antigeny jsou také integrální proteiny vnější membrány. Příklady jsou PorA *N. meningitidis* séro skupiny B; D15 *H. influenzae*; OMP CD *M. catarrhalis*; OMP F *P. aeruginosa*. Tyto proteiny však mají spíše specifické strukturní vlastnosti, zvláště vícečetné amfipatické β -listy, které komplikují jejich přímé použití ve formě purifikovaných (rekombinantních) subjednotkových vakcín.

Navíc je nyní zřejmé, že pro vytvoření vhodné míry ochrany je zapotřebí vícesložkových vakcín (z hlediska proteinů bakteriálního povrchu a integrálních membránových proteinů). Například v případě *B. pertussis* jsou podjednotkové vícesložkové vakcíny výhodnější než jedno- nebo dvou složkové produkty.

Aby bylo možno zahrnout integrální proteiny vnější membrány do takového podjednotkového produktu, musí docházet u produktu k nativnímu (nebo téměř nativnímu) konformačnímu uspořádání (folding) proteinů, aby bylo dosaženo použitelného imunologického účinku. Použití vylučovaných váčků (bleb) vnější membrány může být elegantní řešení problému zahrnutí ochranných integrálních

membránových proteinů do podjednotkové vakcíny při zajištění uspořádání do příslušné konformace.

N. meningitidis séro skupiny B (menB) vylučuje váčky vnější membrány v dostatečných množstvích, aby to umožnilo jejich výrobu v průmyslovém měřítku. Bylo zjištěno, že tyto vícesložkové vakcíny založené na proteinech vnější membrány z kmenů menB vyskytujících se v přírodě, jsou účinné při ochraně mladistvých před onemocněním menB, a byly již registrovány v Latinské Americe. Alternativní metoda přípravy váčků vnější membrány je založena na extrakci bakteriálních buněk detergentem (EP 11243).

Příklady bakteriálních druhů, ze kterých je možno připravit vakcíny založené na váčkách, jsou následující.

Neisseria meningitidis

Neisseria meningitidis (meningokok) je gramnegativní bakterie často izolovaná z horního respiračního traktu člověka. Příležitostně způsobuje invazivní bakteriální onemocnění, jako je bakteremie a meningitida. výskyt meningokokového onemocnění vykazuje zeměpisné, sezónní a meziroční rozdíly (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (doplněk), S 18-S24, 1989). Většina onemocnění v zemích mírného pásma je způsobena kmeny séro skupiny B a jejich výskyt kolísá od 1 do 10/100 000/na rok celkové populace, přičemž někdy se vyskytuje častěji (Kaczmarek, E. B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R. J. P. M., Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. a další, Clin. Infect. Dis. 16: 237 - 246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., a další, Epidemiol. Infect. 105: 119 - 126, 1990).

Výskyt závislý na věku ve dvou vysoce rizikových skupinách, u dětí a u mladistvých, dosahuje vyšších hodnot.

Epidemie s převažujícími meningokoky séro skupiny A se vyskytují převážně v centrální Africe, přičemž někdy se vyskytují s počtem případů až do 1000/100 000/rok (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (doplňek), S18-S24, 1989). Téměř všechny případy meningokokového onemocnění jako celek jsou způsobeny séro skupinami A, B, C, W-135 a Y meningokoků. Je dostupná tetravalentní vakcína založená na kapsulárních polysacharidech proti séro skupinám A, C, W-135, Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335 - 339, 1982).

Polysacharidové vakcíny se v současnosti zlepšují metodou chemické konjugace s nosnými proteiny (Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K., a další, JAMA 275: 1499 - 1503, 1996). Vakcína proti séro skupině B není dostupná, protože kapsulární polysacharid B není imunogenní, nejpravděpodobněji proto, že sdílí strukturní podobnost se složkami hostitelských buněk (Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L. a další, J. Infect. Dis. 126: 514 - 522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Makela, P. M. Lancet ii.: 355 - 357, 1983).

Již mnoho let se úsilí soustředilo na vývoj vakcín založených na vnějších membránách meningokoků (de Moraes, J. C., Perkins, B., Camargo, M. C. a další, Lancet 340: 1074 - 1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E. A. Gronnesby, J. K. a další, 338: 1093 - 1096, 1991). Tyto vakcíny měly účinnosti od 57 % do 85 % u starších dětí (>4 roky) a dospívajících. Většina těchto studií účinnosti byla prováděna na vakcínách OMV (outer membrane vesicles, váčky vnější membrány, odvozené odstraněním LPS z váček) odvozených od kmenů *N. meningitidis* B standardního typu.

Ve vakcínách je přítomno mnoho složek bakteriální vnější membrány, jako je PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB, a příspěvek těchto složek k pozorované ochraně stále ještě potřebuje dalšího upřesnění. Byly definovány další složky vnější membrány bakterií

(použitím zvířecích nebo lidských protilátek), protože by mohly potenciálně přispívat k indukci ochranné imunity, jako je TbpB, NspA (Martin, D., Cadieux, N., Hamel, J., Brodeux, B. R., J. Exp. Med. 185: 1173 - 1183, 1997; Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, P. a další, Inf. Immun. 63: 884 - 890, 1995). Mechanismus ochranné imunity bude zahrnovat baktericidní aktivitu zprostředkovanou protilátkami a opsonofagocytózu.

Četnost výskytu infekcí *Neisseria meningitidis* v posledních několika desetiletích podstatně stoupla. To bylo připisováno vytvoření kmenů odolných vůči většímu počtu antibiotik, a zvýšené expozici v důsledku zvýšení společenských aktivit (například plovárny nebo divadla). Již není neobvyklé izolovat kmeny *Neisseria meningitidis*, které jsou rezistentní na některá nebo všechna standardní antibiotika. Tento jev vyvolal nutnost potřeby nových antimikrobiálních prostředků, vakcín, metod pro screening léčiv a diagnostických testů na tento organismus.

Moraxella catarrhalis

Moraxella catarrhalis (nazývaná také *Branhamella catarrhalis*) je gramnegativní bakterie často izolovaná z horního respiračního traktu člověka. Je odpovědná za několik patologických stavů, z nichž hlavní jsou zánět středního ucha u kojenců a dětí, a pneumonie u starších osob. Je také odpovědná za zánět dutin, a méně často za invazivní onemocnění.

Baktericidní protilátky byly identifikovány u většiny testovaných dospělých (Chapman, A. J. a další (1985), J. Infect. Dis. 151: 878). U kmenů *M. catarrhalis* existují rozdíly ve schopnosti odolávat baktericidní aktivitě v séru: obecně jsou izoláty od nemocných jedinců odolnější než izolátky, které jsou jednoduše kolonizovány (Hol, C. a další (1993), Lancet 341: 1281, Jordan, K. L. a další, (1990), Am. J. Med. 88 (doplněk 5A): 28S). Odolnost proti séru by tedy mohla být

považována jako faktor virulence této bakterie. V sérech dětí, které se zotavily ze zánětu středního ucha, byla v séru pozorována opsonizační aktivita.

Antigeny specifické pro tyto různé imunitní odpovědi u lidí dosud nebyly identifikovány s výjimkou OMP B1, proteinu 84 kDa, jehož exprese je regulována železem, a který je rozpoznáván séry pacientů s pneumonií (Sethi, S., a další, (1995) Infect. Immun. 63: 1516), a UspA1 a UspA2 (Chen D. a další, (1999), Infect. Immun. 67: 1310).

Použitím biochemických metod bylo charakterizováno několik dalších membránových proteinů přítomných na povrchu *M. catarrhalis*, které by byly použitelné při indukci ochranné imunity (přehledný článek viz Murphy, T. F. (1996) Microbiol. Rev. 60: 267). V modelu pneumonie u myši urychluje přítomnost protilátek proti některým z nich (UspA, CopB) odeznění plicní infekce. Další polypeptid (OMP CD) je u kmenů *M. catarrhalis* vysoce konzervovaný a obsahuje homologní oblasti s porinem *Pseudomonas aeruginosa*, u kterého bylo ukázáno, že je účinný u zvířecích modelů proti této bakterii.

M. catarrhalis vytváří váčky na vnější membráně (blebs). Tyto váčky byly izolovány nebo extrahovány různými způsoby (Murphy T. F., Loeb M. R. 1989. Microb. Pathog. 6: 159 - 174; Unhanand M., Maciver, I., Ramillo O., Arencibia-Mireles O., Argyle J. C., McCracken G. H. Jr., Hansen E. J. 1992, J. Infect. Dis. 165: 644 - 650). Ochranná schopnost těchto preparátů váčků byla testována na myším modelu pro vylučování z plic *M. catarrhalis*. Bylo ukázáno, že aktivní imunizace vakcínou založenou na váčcích nebo pasivní přenos protilátky proti váčkům indukuje v tomto modelu významnou ochranu (Maciver I., Unhanand M., McCracken G. H. Jr., Hansen, E. J. 1993. J. Infect. Dis. 168: 469 - 472).

Haemophilus influenzae

Haemophilus influenzae je nepohyblivá gramnegativní bakterie. Jejím jediným přirozeným hostitelem je člověk. Izoláty *H. influenzae* se obvykle klasifikují na základě jejich polysacharidového obalu. Bylo identifikováno šest různých typů obalů označených „a“ až „f“. Izoláty, které nevyvolávají aglutinaci s antisérem proti některému z těchto šesti sérotypů, se zařazují jako netypovatelné, a neexprimují obal.

H. influenzae typu b (Hib) je jasně odlišná od dalších typů v tom, že je hlavní příčinou bakteriální meningitidy a systémových onemocnění. Netypovatelné kmeny *H. influenzae* (NTHi) se izolují z krve pacientů se systémových onemocněním pouze příležitostně. NTHi je běžná příčina pneumonie, vypuknutí chronické bronchitidy, zánětu dutin a zánětu středního ucha. U kmenů NTHi dochází k velké variabilitě, jak bylo identifikováno analýzou klonů, zatímco kmeny Hib jako celek jsou homogennější.

Bylo ukázáno, že různé proteiny *H. influenzae* se účastní patogeneze nebo po vakcínaci vyvolávají ve zvířecích modelech ochranu.

Byla ukázána adherence NTHi k lidským epiteliálním buňkám nosohltanu (Read R. C. a další, 1991, J. Infect. Dis. 163: 549). Kromě fimbrií a pilusů bylo v NTHi identifikováno mnoho adhesinů (Brinton C. C. a další, 1989, Pediatr. Infect. Dis. J. 8: S54; Kar S. a další, 1990, Infect. Immun. 58: 903; Gildorf J. R. a další, 1992, Infect. Immun. 60: 374; St. Geme J. W. a další, 1991, Infect. Immun. 59: 3366; St. Geme J. W. a další, 1993, Infect. Immun. 61: 2233). Mezi těmito kmeny bylo ukázáno, že adhesi NTHi k epiteliálním buňkám zprostředkují dva vysokomolekulární proteiny exponované na povrchu označené HMW1 and HMW2 (St. Geme J. W. a další, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2875). U kmenů NTHi byla identifikována další skupina vysokomolekulárních proteinů, přičemž tyto kmeny postrádají proteiny ze skupiny HMW1/HMW2. NTHi protein Hia 115 kDa (Barenkamp S.

J., St Geme S. W. 1996, Mol. Microbiol, v tisku) má vysokou podobnost s adhesinem Hsf exprimovaným kmeny *H. influenzae* typu b (St. Geme J. W. a další, 1996, J. Bact. 178: 6281). Další protein, protein Hap, je podobný se serinovými proteázami IgA1, a bylo ukázáno, že se účastní jak adheze, tak i vstupu do buněk (St. Geme J. W. a další, 1994, Mol. Microbiol. 14: 217).

Identifikováno a očíslováno bylo pět hlavních proteinů vnější membrány (OMP). Originální studie používající kmeny *H. influenzae* typu b ukázaly, že protilátky specifické pro OMP P1 a P2 chránily mláďata krys před následným testovacím podáním bakterie (Loeb M. R. a další, 1987, Infect. Immun. 55: 2612; Musson R. S. Jr. a další, 1983, J. Clin. Invest. 72: 677). Bylo zjištěno, že P2 je schopen indukovat baktericidní a opsonické protilátky, které jsou zaměřeny proti různým oblastem přítomným u struktur smyček exponovaných na povrchu tohoto integrálního OMP (Haase E. M. a další, 1994, Infect. Immun. 62: 3712; Troelstra A. a další, 1994, Infect. Immun. 62: 779). Lipoprotein P4 může také indukovat baktericidní protilátky (Green B. A. a další, 1991, Infect. Immun. 59: 3191).

OMP P6 je konzervovaný lipoprotein asociovaný s peptidoglykanem, který tvoří až 1 až 5 % vnější membrány (Nelson M. B. a další, 1991, Infect. Immun. 59: 2658). Později byl rozpoznán lipoprotein s přibližně stejnou molekulovou hmotností nazvaný PCP (P6 crossreactive protein) (Deich R. M. a další, 1990, Infect. Immun. 58: 3388). Směs konzervovaných lipoproteinů P4, P6 a PCP neumožnila vyvinutí ochrany při měření na modelu zánětu středního ucha u činčily (Green B. A. a další, 1993, Infect. immun. 61: 1950). Samotný P6 pravděpodobně indukuje ochranu u modelu činčily (Demaria T. F. a další, 1996, Infect. Immun. 64: 5187).

Byl také popsán fimbrinový protein (Miyamoto N., Bakaletz, L. O. 1996, Microb. Pathog. 21: 343) s homologií s OMP P5, který má sám sekvenční homologii s integrálním OmpA *Escherichia coli* (Miyamoto

N., Bakaletz, L. O. 1996. *Microb. Pathog.* 21: 343; Munson R. S. Jr. a další, 1993, *Infect. Immun.* 61: 1017). Zdá se, že NTHi adheruje ke sliznici prostřednictvím fimbrií.

V souladu s pozorováními u gonokoků a meningokoků exprimuje NTHi dvojí lidský transferinový receptor složený z TbpA a TbpB, jestliže se kultivuje při limitaci železem. Protilátka anti-TbpB chrání krysí mláďata (Loosmore S. M. a další, 1996, *Mol. Microbiol.* 19: 575). Pro NTHi byl také popsán receptor hemoglobin/haptoglobin (Maciver I. a další, 1996, *Infect. Immun.* 64: 3703). Byl také identifikován receptor pro Haem:Hemopexin (Cope L. D. a další, 1994, *Mol. Microbiol.* 13: 868). U kmenů NTHi je také přítomný receptor pro laktoferin, který však nebyl dosud charakterizován (Schryvers A. B. a další, 1989, *J. Med. Microbiol.* 29: 121). U kmenů NTHi dosud nebyl popsán protein podobný proteinu FrpB neisserií.

OMP s molekulovou hmotností 80kDa, povrchový antigen D15, poskytuje ochranu proti NTHi v modelu testovacího podání myším (Flack F. S. a další, 1995, *Gene* 156: 97). Vnější membránový lipoprotein 42kDa, LPD je u různých kmenů *Haemophilus influenzae* konzervován a indukuje baktericidní protilátky (Akkoyunlu M. a další, 1996, *Infect. Immun.* 64: 4586). Menší, 98kDa OMP (Kimura A. a další, 1985, *Infect. Immun.* 47: 253), je podle zjištění ochranný antigen, přičemž tento OMP by mohl být jeden z OMP indukovatelných limitací železem, nebo adhesinů s vyšší molekulovou hmotností, které byly charakterizovány později. *H. influenzae* poskytuje IgA1-proteázovou aktivitu (Mulks M. H., Shoberg R. J. 1994, *Meth. Enzymol.* 235: 543). Proteázy IgA1 bakterie NTHi mají vysoký stupeň antigenní variability (Lomholt H., van Alphen L., Kilian, M. 1993, *Infect. Immun.* 61: 4575).

Bylo ukázáno, že další OMP bakterie NTHi, OMP26, který má molekulovou hmotnost 26 kDa, zvyšuje u krysího modelu vylučování z plic (Kyd, J. M., Cripps, A. W. 1998, *Infect. Immun.* 66: 2272). Bylo

také ukázáno, že protein NTHi HtrA je ochranný antigen. Tento protein samozřejmě chránil čínčilu před zánětem středního ucha a chránil krysy mláďata proti bakteremii *H. influenzae* typu b (Loosmore S. M. a další, 1998, Infect. Immun. 66: 899).

Váčky vnější membrány (neboli blebs) byly izolovány z *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). Tyto váčky byly spojovány s indukci permeability bariéry mezi krví a mozkem (Wiwpelwey B., Hansen E. J., Scheld W. M. 1989, Infect. Immun. 57: 2559 - 2560), indukci meningeálního zánětu (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) a příjmem DNA (Concino M. F., Goodgal S. H. 1982, J. Bacteriol. 152: 441 - 450).

Tyto váčky jsou schopny vázat se a být absorbovány epitelem nosní sliznice (Harada T., Shimuzu T., Nishimoto K., Sakakura Y. 1989, Acta Otorhinolarygol. 246: 218 - 221), což ukazuje, že ve váčkách by mohly být přítomny adhesiny a/nebo kolonizační faktory. Imunitní odpověď proti proteinům přítomným ve váčkách vnější membrány byla pozorována u pacientů s různými onemocněními *H. influenzae* (Sakakura Y., Harada T., Hamaguchi Y., Jin C. S. 1988, Acta Otorhinolarygol. doplněk (Stockh.) 454: 222 - 226; Harada T., Sakakura Y., Miyoshi Y. 1986, Rhinology 24: 61 - 66).

Pseudomonas aeruginosa

Rod *Pseudomonas* se skládá z gramnegativních, přímých a mírně zakřivených tyčinek s polárními bičíky, které nevytvářejí spóry. Z důvodů omezených metabolických požadavků jsou *Pseudomonas* spp. všudypřítomné, a jsou široce rozšířeny v půdě, vzduchu, odpadní vodě a v rostlinách. Bylo také ukázáno, že četné druhy *Pseudomonas*, jako je *P. aeruginosa*, *P. pseudomallei*, *P. mallei*, *P. maltophilia* a *P.*

cepacia, jsou patogenní pro člověka. V tomto seznamu je za důležitý lidský patogen považována *P. aeruginosa*, protože je spojená s příležitostnou infekcí hostitelů s oslabenou imunitou, a je odpovědná za vysokou úmrtnost u hospitalizovaných pacientů. Nosokominální infekce *P. aeruginosa* postihuje primárně pacienty léčené dlouhodobě, kteří dostávají imunosupresivní látky, kortikosteroidy, antimetabolická antibiotika, nebo jsou léčeni ozářením.

Pseudomonas, a zvláště *P. aeruginosa*, produkují řadu toxinů (jako jsou hemolysiny, fibrinolysiny, esterázy, koagulázy, fosfolipázy, endo- a exotoxiny), které přispívají k patogenicitě této bakterie. Navíc mají tyto organismy vlastní vysokou rezistenci na antibiotika v důsledku přítomnosti pump vytlačujících většinu léčiv. Tato vlastnost často komplikuje průběh onemocnění.

V důsledku nekontrolovaného použití antibakteriálních chemoterapeutik během posledních třiceti let podstatně vzrostla frekvence nosokominálních infekcí způsobených *P. aeruginosa*. V USA je například ekonomický dopad nosokominálních infekcí *P. aeruginosa* odhadován ročně na 4,5 miliard dolarů. Proto je velmi nutný vývoj vakcíny pro aktivní nebo pasivní imunizaci proti *P. aeruginosa* (pro přehled viz Stanislavsky a další, 1997, FEMS Microbiol. Lett. 21: 243 - 277).

Předmětem vývoje vakcín byly různé další s buňkami asociované a sekrenované antigeny *P. aeruginosa*. Mezi antigeny *Pseudomonas* bylo zjištěno, že slizovitá látka, která je ve formě extracelulárního hleny složena převážně z alginátu, je heterogenní z hlediska velikosti a imunogenicity. Alginátové složky s vysokou molekulovou hmotností (30 až 300 kDa) se jeví jako obsahující konzervované epitopy, zatímco alginátové složky s nižší molekulovou hmotností (10 až 30 kDa) obsahují konzervované epitopy navíc k jedinečným epitopům. Mezi proteiny asociovanými s povrchem, PcrV, které jsou součástí sekrečně-translačního aparátu typu III, je také

podle zjištění možnost nalézt zajímavý cíl pro vakcinaci (Sawa a další, 1999, *Nature Medicine* 5: 392 - 398).

Antigeny exponované na povrchu včetně O-antigenů (O-specifický polysacharid LPS) nebo H-antigenů (antigeny bičíků) byly používány pro zjištění sérotypů kvůli jejich vysoce imunogenní povaze. Byly objasněny chemické struktury opakujících se jednotek O-specifických polysacharidů, a tyto údaje dovolily identifikaci 31 chemotypu *P. aeruginosa*. Konzervované epitopy v rámci všech sérotypů *P. aeruginosa* jsou umístěny v oligosacharidu jádra a oblasti lipidu A LPS a imunogeny obsahující tyto epitopy indukují u myši zkříženou ochrannou imunitu proti různým imunotypům *P. aeruginosa*. Vnější jádro LPS je považováno za ligand pro vazbu *P. aeruginosa* na dýchací cesty a buňky očního epitelu zvířat. Mezi různými sérotypy však existuje heterogenita v uvedené oblasti vnějšího jádra. Epitopy ve vnitřním jádře jsou vysoce konzervované a bylo ukázáno, že jsou přístupné na povrchu, a nejsou maskovány O-specifickým polysacharidem.

Pro vyšetření ochranných vlastností proteinů OM byla použita vakcína obsahující proteiny OM *P. aeruginosa* s molekulovými hmotnostmi v rozmezí od 20 do 100 kDa při předklinických a klinických experimentech. Tato vakcína byla ve zvířecích modelech účinná proti testovacímu podání *P. aeruginosa* a indukovala vysoké hladiny specifických protilátek u lidských dobrovolníků. Plasma lidských dobrovolníků obsahující protilátky proti *P. aeruginosa* poskytovala pasivní ochranu a napomáhala při zotavení 87 % pacientů s vážnými formami infekce *P. aeruginosa*. Nedávno bylo ukázáno, že hybridní protein obsahující části proteinů vnější membrány OprF (aminokyseliny 190-342) a OprI (aminokyseliny 21-83) *Pseudomonas aeruginosa* fúzovaný s glutathion-S-transferázou chrání myši proti 975násobku 50% letální dávky *P. aeruginosa* (Knapp a další, 1999, *Vaccine*, 17: 1663 - 1669).

Autoři předkládaného vynálezu zjistili řadu nevýhod v souvislosti s výše uvedenými vakcínami založenými na váčcích standardního typu (bud' přirozených nebo chemicky vyrobených).

Jako příklady těchto problémů lze uvést:

- přítomnost imunodominantních, ale variabilních proteinů na váčku (blebu) (PorA, TbpB, Opa [*N. meningitidis* B]; P2, P5 [netypovatelná *H. influenzae*]) - tyto váčky jsou účinné pouze proti omezenému výběru bakteriálních druhů. Typová specifita baktericidní odpovědi protilátek může předpokládat použití takových vakcín u dětí;
- přítomnost neprotektivních (nerelevantních) antigenů (Rmp, H8,...) na váčku - antigeny, které jsou neužitečnou zátěží pro imunitní systém;
- nepřítomnost nebo přítomnost důležitých molekul, které jsou produkovány podmíněčně (například proteinů vnější membrány redukováných železem, IROMP, in vivo - regulovaných expresních mechanismů) - tyto podmínky je při produkci váčků obtížné řídit a je tedy obtížné optimalizovat množství antigenu na povrchu;
- nízká hladina exprese ochranných (zvláště konzervovaných) antigenů (NspA, P6);
- toxicita LPS zbývajících na povrchu váčků;
- potenciální indukce autoimunitní odpovědi mezi strukturami identickými s hostitelem (například kapsulární polysacharid u *Neisseria meningitidis* séro skupiny B, lakto-N-neotetraóza u lipopolysacharidů *Neisseria*, sacharidová struktura uvnitř LPS NTHi, sacharidové struktury u pilusů).

Tyto problémy mohou zabránit použití vakcín založených na váčcích jako vakcinačních prostředků pro humánní použití. Je tomu tak zvláště při pediatrickém použití (<4 roky), kde je zvláště důležitá

reaktogenicita proti vakcínám založeným na váčcích, a kde vakcíny založené na váčcích (například dříve uváděná vakcína založená na váčcích MenB dodávaná na trh) se ukázaly jako neúčinné při poskytování imunitní ochrany. Předkládaný vynález tedy poskytuje způsoby odstranění výše uvedených problémů použitím bakteriálních kmenů získaných pomocí genetického inženýrství, které vedou ke zlepšeným vakcínám založeným na váčcích (bleb vaccines). Tyto metody budou zvláště použitelné při vytváření nových vakcín proti bakteriálním patogenům, jako je *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, a další.

Vakcíny podle vynálezu, založené na váčcích, jsou navrženy tak, aby se imunitní odpověď soustředila na několik protektivních (s výhodou konzervovaných) antigenů nebo epitopů - formulovaných ve vícesložkové vakcíně. Jestliže jsou tyto antigeny integrální proteiny OMP, jejich správné uspořádání do patřičné konformace zajistí váčky vnější membrány vakcín založených na váčcích. Předkládaný vynález poskytuje způsoby pro optimalizaci složení vakcín založených na OMV (váčcích) z hlediska OMP a LPS delecí imunodominantní proměnné stejně jako neprotektivních OMP, vytvořením konzervovaných OMP a delecí různých oblastí, regulací ochranných OMP ke zvýšení exprese, a odstraněním řídicích mechanismů exprese (jako je omezení způsobené železem) ochranných OMP. Navíc poskytuje vynález snížení toxicity lipidů a modifikací lipidové části, nebo změnou fosforoylového složení při zachování adjuvantní aktivity nebo jejím maskováním. Každá z těchto nových metod a vylepšení sama o sobě zlepšuje vakcínu založenou na váčcích, avšak kombinace jedné nebo více těchto metod působí společně tak, že se získá optimalizovaná uměle vytvořená vakcína založená na váčcích, která má imunologické ochranné vlastnosti a která je netoxická, a tím zvláště vhodná pro pediatrické použití.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje prostředek založený na váčcích získaný metodami genetického inženýrství z gramnegativního bakteriálního kmene, který se vyznačuje tím, že uvedený prostředek je získatelný použitím jednoho nebo více způsobů zvolených z následující skupiny:

- a) způsob snížení imunodominantních proměnných nebo neprotektivních antigenů u prostředku založeného na váčcích, který zahrnuje kroky zjištění identity takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene pro produkci menšího množství nebo žádného uvedeného antigenu, a vytvoření váčků z tohoto kmene;
- b) způsob regulace ke zvýšení exprese (upregulation) ochranných, endogenních (a s výhodou konzervovaných) antigenů OMP v rámci prostředku založeného na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene zavedením silnější promotorové sekvence proti směru transkripce vzhledem ke genu kódujícímu uvedený antigen tak, že tento gen se exprimuje ve vyšší míře, než nemodifikovaný váček, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- c) způsob regulace ke zvýšení exprese podmíněčně exprimovaných, ochranných (a s výhodou konzervovaných) antigenů OMP v rámci prostředku založeného na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene pro odstranění represivních řídicích mechanismů jeho exprese (jako je omezení působením železa) a vytvoření váčků z uvedeného řetězce;

- d) způsob modifikace části lipidu A bakteriálního LPS v rámci prostředí založeného na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace genu, který se účastní procesu, který učiní část lipidu A LPS toxickou, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby byla snížena nebo vypnuta exprese uvedeného genu, a vytvoření váčku z uvedeného kmene;
- e) způsob modifikace části lipidu A bakteriálního LPS v rámci prostředí založeného na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace genu, který se účastní procesu, který učiní část lipidu A LPS méně toxickou, zkonstruování bakteriálního kmene zavedením silnější promotorové sekvence proti směru transkripce uvedeného genu tak, že tento gen je exprimován s vyšší hladinou než u nemodifikovaného váčku, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- f) způsob snížení toxicity lipidu A v rámci prostředí založeného na váčcích a zvýšení hladin ochranných antigenů, který zahrnuje kroky zkonstruování chromosomu bakteriálního kmene tak, aby obsahoval gen kódující peptid polymyxinu A nebo jeho derivát nebo analog fúzovaný s ochranným antigenem, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- g) způsob vytvoření konzervovaných antigenů OMP na prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby byly vypuštěny variabilní oblasti genu kódujícího uvedený antigen, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- h) způsob snížení exprese v rámci prostředí založeného na váčcích, antigenu, který sdílí strukturní podobnost s lidskou strukturou a může být schopen indukovat autoimunitní odpověď u lidí (jako je kapsulární polysacharid *N.*

meningitidis B), který zahrnuje kroky identifikace genu, který se účastní biosyntézy antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby se snížila nebo vypnula exprese uvedeného genu, a vytvoření váčků z uvedeného kmene; nebo

- i) způsob regulace exprese ve smyslu jejího zvýšení ochranných, endogenních (s výhodou konzervovaných) antigenů OMP v rámci prostředku založeného na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby byla do chromosomu zavedena jedna nebo více dalších kopií genu kódujícího uvedený antigen, řízená heterologní, silnější promotorovou sekvencí, a vytvoření váčků z uvedeného kmene.

Další provedení vynálezu zahrnují výhodné způsoby pro získání výše uvedeného prostředku založeného na váčcích, včetně optimálního umístění silných promotorů pro regulaci exprese ve smyslu jejího zvýšení u antigenů v rámci váčků, preferenčních antigenů pro regulaci ve smyslu zvýšení nebo snížení exprese u různých bakteriálních kmenů pro získání prostředků založených na váčcích, které jsou zvláště vhodné pro použití ve vakcínách. Poskytují se také výhodné prostředky obsahují váčky podle vynálezu, které jsou zvláště vhodné pro globální vakcíny proti některým stavům onemocnění. Jako další provedení vynálezu se poskytují vektory pro přípravu váčků podle vynálezu a modifikované bakteriální kmeny, ze kterých se váčky podle vynálezu produkují.

Předkládaný vynález poprvé poskytuje vakcínu založenou na váčcích, která je imunoprotektivní a netoxická při použití u dětí do čtyř let věku.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: Reaktivita monoklonální protilátky 735 mAb na různých koloniích

Obr. 2: Reaktivity specifických monoklonálních protilátek zjišťovaná metodou ELISA celých buněk

Obr. 3: Schematické znázornění vektorů pCMK používaných pro dodávání genů, operonů a/nebo expresních kazet do genomu *Neisseria meningitidis*

Obr. 4: Analýza exprese PorA v celkových proteinových extraktech rekombinantní *N. meningitidis* séroskupiny B (deriváty H44/76). Celkové proteiny byly izolovány z kmenů *cps-* (dráhy 3 a 4), *cps- porA::pCMK+* (dráhy 2 a 5) a *cps- porA::nspA* (dráhy 1 a 6) rekombinantní *N. meningitidis* séroskupiny B a byly analyzovány za podmínek SDS PAGE v 12% polyakrylamidovém gelu. Gely byly barveny Coomassie blue (dráhy 1 až 3) nebo převedeny na nitrocelulózovou membránu a imunologicky barveny monoklonální protilátkou anti-PorA.

Obr. 5: Analýza exprese NspA v proteinových extraktech rekombinantních kmenů *N. meningitidis* séroskupiny B (deriváty H44/76). Proteiny byly extrahovány z úplných bakterií (dráhy 1 až 3) nebo preparátech váček vnější membrány (dráhy 4 až 6), odděleny SDS-PAGE na 12% akrylamidovém gelu a analyzovány imunologickým přenosem s použitím polyklonálního séra anti-NspA. Vzorky odpovídající *cps-* (dráhy 1 a 6), *cps- porA::pCMK+* (dráhy 3 a 4) a *cps- porA::nspA* (dráhy 2 a 5) byly analyzovány. Byly detekovány dvě formy NspA: zralá forma (18 kDa), která migruje spolu s rekombinantním čištěným NspA, a kratší forma (15 kDa).

Obr. 6: Analýza exprese D15/omp85 v proteinových extraktech rekombinantních kmenů *N. meningitidis* séroskupiny B (deriváty H44/76). Proteiny byly extrahovány z preparátů váček vnější

membrány a byly děleny SDS-PAGE na 12% akrylamidovém gelu a analyzovány imunologickým přenosem použitím polyklonálního séra anti-omp85. Byly analyzovány vzorky odpovídající *cps*- (dráha 2), a *cps*-, *PorA*+, *pCMK+Omp85/D15* (dráha 1) rekombinantních kmenů *N. meningitidis* séroskupiny B.

Obr. 7: Obecná strategie pro modulaci genové exprese dodáním promotoru (RS znamená restrikční místo).

Obr. 8: Analýza váčků vnější membrány vytvořených rekombinantními kmeny *N. meningitidis* séroskupiny B *cps*- (deriváty H44/76). Proteiny byly extrahovány z preparátů váčků vnější membrány a byly děleny SDS-PAGE za redukčních podmínek na 4 až 20% gradientovém polyakrylamidovém gelu. Gel byl barven Coomassie brilliant blue R250. Dráhy 2, 4, 6 odpovídají 5 µg celkových proteinů, zatímco na dráhy 3, 5 a 7 bylo nanášeno 10 µg proteinů.

Obr. 9: Konstrukce plasmidu s nahrazeným promotorem použitého pro regulaci exprese/produkce ke zvýšení exprese Omp85/D15 v *Neisseria meningitidis* H44/76.

Obr. 10: Analýza exprese OMP85 v úplných proteinových extraktech rekombinantního *NmB* (deriváty H44/76). Gely byly barveny Coomassie blue (A) nebo převedeny na nitrocelulózovou membránu a imunologicky barveny králičí monoklonální protilátkou anti-OMP85 (*N. gono*) (B).

Obr. 11: Analýza exprese OMP85 v preparátech OMV rekombinantní *NmB* (deriváty H44/76). Gely byly barveny Coomassie blue (A) nebo převedeny na nitrocelulózovou membránu a imunologicky barveny králičí polyklonální protilátkou anti-OMP85 (B).

Obr. 12: Schematické znázornění rekombinantní strategie PCR použité pro delecí *lacO* v chimérickém promotoru *porA/lacO*.

Obr. 13: Analýza exprese Hsf v úplných proteinových extraktech rekombinantní *N. meningitidis* séroskupiny B (deriváty H44/76).

Celkové proteiny byly izolovány z Cps-PorA⁺ (dráha 1), a Cps-PorA⁺/Hsf (dráha 2) rekombinantních kmenů *N. meningitidis* séro skupiny B a byly analyzovány za podmínek SDS-PAGE ve 12% polyakrylamidovém gelu. Gely byly barveny Coomassie blue.

Obr. 14: Analýza exprese GFP v úplných proteinových extraktech rekombinantní *N. meningitidis* (derivát H44/76). Celkový protein byl izolován z rekombinantních kmenů Cps⁻, PorA⁺ (dráha 1), Cps⁻, PorA⁻ GFP⁺ (dráhy 2 a 3). Proteiny byly děleny PAGE-SDS na 12% polyakrylamidovém gelu a potom barveny Coomassie blue.

Obr. 15: Znázornění rozložení hlavních proteinů na povrchu různých rekombinantních preparátů váčků při analýze SDS-PAGE (barvení Coomassie).

Obr. 16: Specifická odpověď anti-Hsf pro různé preparáty váčků a rekombinantních váčků použitím čištěného rekombinantního proteinu Hsf.

Obr. 17: Analýza exprese NspA v úplných proteinových extraktech rekombinantní NmB (deriváty séro skupiny B). Gely byly barveny Coomassie blue (A) nebo převedeny na nitrocelulózovou membránu a imunologicky barveny myší monoklonální protilátkou anti-PorA (B) nebo myší polyklonální protilátkou anti-NspA (C).

Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká obecného souboru nástrojů a metod schopných využití pro výrobu zlepšených, geneticky zkonstruovaných váčků z gramnegativních bakteriálních kmenů. Vynález zahrnuje způsoby použití pro výrobu rekombinantních váčků, které jsou více imunogenní, méně toxické a bezpečnější pro použití v humánní a/nebo veterinární vakcíně. Předkládaný vynález navíc také popisuje specifické metody nezbytné pro konstrukci, výrobu, získávání a využívání rekombinantních, zkonstruovaných váčků z různých

gramnegativních bakterií, pro vakcinační, terapeutické a/nebo diagnostické účely. Způsoby podle vynálezu je možno manipulovat s biochemickým složením bakteriálních váčků působením na expresi nebo změnu exprese bakteriálních genů kódujících produkty přítomné v nebo asociované s váčky vnější membrány bakterií (proteiny vnější membrány neboli OMP). Produkce váčků s použitím metody genetické modifikace pro zvýšení, snížení nebo zajištění podmíněčnosti exprese jednoho nebo více genů kódujících složky vnější membrány je také zahrnuto v rámci tohoto vynálezu.

Pro jasnost, termín „expresní kazeta“ zde bude označovat všechny genetické prvky nezbytné pro expresi genu nebo operonu a pro produkci a směřování odpovídajícího sledovaného proteinu nebo proteinů do váčků vnější membrány, odvozených z daného bakteriálního hostitele. Nevyčerpávající seznam těchto vlastností zahrnuje řídicí prvky (transkripční a/nebo translační), oblasti kódující proteiny a směrovací signály, včetně vhodných mezer mezi nimi. Odkaz na vložení promotorových sekvencí znamená pro účely vynálezu vložení sekvence s alespoň jednou promotorovou funkcí, s výhodou jednou nebo více dalšími genetickými regulačními prvky obsaženými v rámci expresní kazety. Navíc bude termín „integrativní kazeta“ označovat všechny genetické prvky, nezbytné pro integraci segmentu DNA dodaného bakteriálního hostitele. Nevyčerpávající seznam těchto znaků zahrnuje dodávací vehikulum (nebo vektor) s oblastmi poskytujícími rekombinace a markery umožňující selekci nebo negativní selekci.

Pro účely vyjasnění označují termíny „zkonstruování bakteriálního kmene pro produkci menšího množství uvedeného antigenu“ jakýkoli prostředek pro snížení exprese sledovaného antigenu vzhledem k nemodifikovanému (tj. v přírodě se vyskytujícímu) váčku tak, že exprese je alespoň o 10 % nižší než exprese v nemodifikovaném váčku. S výhodou je exprese alespoň o 50 % nižší. Termín „silnější promotorová sekvence“ označuje regulační řídicí

prvek, který zvyšuje transkripci genu kódujícího sledovaný antigen. Termín „regulace exprese ke zvýšení exprese“ (upregulation) označuje jakýkoli prostředek pro zvýšení exprese sledovaného antigenu vzhledem k nemodifikovanému (tj. v přírodě se vyskytujícímu) váčku. Je třeba rozumět, že míra „regulace ke zvýšení exprese“ se bude lišit v závislosti na konkrétním sledovaném antigenu, ale nepřevýší míru, která rozbije integritu membrány váčku. Regulace ke zvýšení exprese antigenu označuje expresi, která je alespoň o 10 % vyšší než exprese nemodifikovaného váčku. S výhodou je tato exprese vyšší o alespoň 50 %, výhodněji je alespoň o 100 % (dvojnásobně) vyšší.

Provedení vynálezu se týká jednotlivých způsobů výroby zlepšených zkonstruovaných váčků, kombinace těchto způsobů a prostředků s obsahem váčků vyrobených jako výsledek těchto způsobů. Další provedení vynálezu se týká genetických nástrojů použitých s cílem geneticky modifikovat zvolený bakteriální kmen, aby bylo možno z tohoto kmene extrahovat zlepšené zkonstruované váčky.

Konstrukční kroky způsobu podle vynálezu mohou být prováděny řadou způsobů známých odborníkům v oboru. Například sekvence (například promotory nebo otevřené čtecí rámce) mohou být vloženy, a promotory/geny mohou být přerušeny technikou vložení transposonu. Například regulace exprese genu ke zvýšení exprese může být dosaženo vložním silného promotoru přes transposon o velikosti až 2 kb proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu genu (výhodněji 200 až 600 bp proti směru transkripce, nejvýhodněji přibližně 400 bp proti směru transkripce (upstream)). Může být také použita bodová mutace a/nebo delece (zvláště pro expresi genu se sníženou intenzitou).

Tyto metody však mohou být poměrně nestabilní nebo nejisté, a proto je výhodné, jestliže se konstrukční krok (zejména pro způsoby a), b), c), d), e), h) a i) popsané výše) provádí přes homologní rekombinaci. S výhodou probíhá tento děj mezi sekvencí

(rekombinogenní oblast) alespoň 30 nukleotidů na bakteriálním chromosomu a sekvencí (druhá rekombinogenní oblast) alespoň 30 nukleotidů na vektoru transformovaném do tohoto řetězce. Oblasti mají s výhodou velikost 40 až 1000 nukleotidů, výhodněji 100 až 800 nukleotidů, nejvýhodněji 500 nukleotidů. Tyto rekombinogenní oblasti by měly být dostatečně podobné v tom, že jsou schopny vzájemně hybridizovat za vysoce stringentních podmínek (jak bude definováno později).

Rekombinační děje mohou probíhat použitím jediné rekombinogenní oblasti na chromosomu a vektoru, nebo přes dvojitý děj typu crossing-over (s dvěma oblastmi na chromosomu a vektorem). Pro provedení dvojitého rekombinančního děje by měla být vektorem kruhová nebo přímá molekula DNA (viz obr. 7). Výhodné je, jestliže se používá dvojitý rekombinační děj a použitý vektor je přímý, protože takto modifikovaná bakterie bude stabilnější z hlediska reverzních dějů. S výhodou mají dvě rekombinogenní oblasti na chromosomu (a jedna na vektoru) podobnou (nejvýhodněji stejnou) délku, aby byl podporován dvojitý proces crossing-over. Dvojitý crossing-over funguje tak, že rekombinují dvě rekombinogenní oblasti na chromosomu (oddělené nukleotidovou sekvencí „X“) a dvě rekombinogenní oblasti na vektoru (oddělené nukleotidovou sekvencí „Y“) za získání nezměněného chromosomu s tím rozdílem, že byly zaměněny oblasti X a Y. Poloha rekombinogenních oblastí může být umístěna jak proti směru transkripce, tak i po směru transkripce, nebo může obklopovat sledovaný otevřený čtecí rámec. Tyto oblasti se mohou skládat z kódujících, nekódujících, nebo směsi kódujících a nekódujících sekvencí. Identita X a Y bude záviset na požadovaném účinku. X může být celý nebo část otevřeného čtecího rámce a Y nemusí obsahovat žádné nukleotidy, což by vedlo k deleci sekvence X z chromosomu. Alternativně Y může být oblast silného promotoru pro vložení proti směru transkripce otevřeného čtecího rámce, a proto oblast X nemusí obsahovat žádné nukleotidy.

Vhodné vektory se budou lišit svým složením v závislosti na tom, jaký rekombinantní děj se má provádět, a jaký je konečný účel rekombinačního děje. Integrativní vektory používané pro dodávání oblasti Y mohou být podmíněčně replikativní nebo „suicide“ plasmidy, bakteriofágy, transposony nebo přímé fragmenty DNA získané restrikční hydrolýzou nebo amplifikací PCR. Selektce rekombinantního děje se provádí pomocí selektovatelného genetického markeru, jako jsou geny propůjčující rezistenci na antibiotika (například kanamycin, erythromycin, chloramfenikol nebo gentamycin), geny propůjčující rezistenci na těžké kovy a/nebo toxické sloučeniny nebo geny kompenzující auxotrofní mutace (například *pur*, *leu*, *met*, *aro*).

Způsob a) a f) - Regulace snižující expresi/odstranění variabilních a neprotektivních imunodominantních antigenů

Mnoho povrchových antigenů je mezi bakteriálními kmeny variabilních a jako důsledek poskytují ochranu proti pouze omezenému souboru blízce příbuzných kmenů. Jedno provedení tohoto vynálezu zahrnuje snížení exprese, nebo s výhodou odstranění genu nebo genů kódujících variabilní povrchový protein nebo proteiny, což vede k vytvoření bakteriálního kmene produkujícího váčky, které při podání ve vakcíně mají silnější schopnost zkřížené reaktivity proti různým kmenům v důsledku vyššího vlivu konzervovaných proteinů (které se na vnějších membránách zachovaly) na imunitní systém vakcínovaného pacienta. Příklady těchto variabilních antigenů zahrnují: pro *Neisseria* - pilusy (PilC), které podléhají antigenním variacím, PorA, Opa, TbpB, FrpB; pro *H. influenzae* - P2, P5, pilin, IgA1-proteáza; a pro *Moraxella* - CopB, OMP106.

Další typy genů, které by mohly být regulovány ke snížení exprese nebo vyphnuty, jsou geny, které může bakterie *in vivo* snadno zapnout (exprimovat) nebo vypnout. Protože proteiny vnější membrány kódované těmito geny nejsou vždy na bakterii přítomny, přítomnost

těchto proteinů v prostředcích založených na váčcích může být také škodlivá pro účinnost vakcíny z výše uvedených důvodů. Výhodný příklad pro regulaci ke snížení exprese nebo delecí je protein *Neisseria Opc*. Imunita anti-Opc indukovaná vakcínou založenou na váčcích obsahující Opc by měla pouze omezenou ochrannou schopnost, protože infekční organismus by se snadno stal Opc⁻. Další příklady takových proteinů jsou proteiny *H. influenzae* HgpA a HgpB.

Při procesu a) se reguluje exprese neprotektivních genů ve smyslu snížení exprese, nebo se tyto geny nakonec vypnou. To má výše uvedenou překvapivou výhodu v tom, že se imunitní systém soustředí na lepší antigeny, které jsou přítomny na vnějším povrchu váčků v nižších množstvích.

Kmen může být zkonstruován tímto způsobem pomocí celé řady strategií včetně vložení transposonu nebo rozbití kódující oblasti promotorové oblasti genu, nebo bodovými mutacemi nebo delecemi pro dosažení podobného výsledku. Pro odstranění (delecí) genu z chromosomu může být také použita homologní rekombinace (kde sekvence X obsahuje část (s výhodou veškerou) kódující sekvenci sledovaného genu). Homologní rekombinace může být navíc použita pro změnu silnějšího promotoru genu za slabší (nebo žádný) promotor (jestliže nukleotidová sekvence X obsahuje část (s výhodou veškerou) promotorovou oblast genu, a nukleotidová sekvence Y obsahuje buď slabší promotorovou oblast (což vede ke snížení exprese sledovaného genu nebo genů/operonu nebo operonů) nebo žádnou promotorovou oblast). V tomto případě je výhodné, aby se rekombinační děj prováděl uvnitř oblasti chromosomu 1000 bp proti směru transkripce sledovaného genu.

Y může alternativně propůjčit podmíněčnou transkripční aktivitu, která vede k podmíněčné expresi sledovaného genu nebo genů/operonu nebo operonů (regulace ve smyslu snížení exprese).

Tohoto způsobu se využívá při expresi molekul, které jsou toxické pro bakteriálního hostitele nebo jím nejsou dobře podporovány.

Většina z výše uvedených proteinů jsou integrální OMP a jejich variabilita může být omezena pouze na několik jejich smyček exponovaných na povrchu. Další provedení vynálezu (způsob g)) pokrývá delecí oblastí DNA kódujících tyto smyčky exponované na povrchu, což vede k expresi integrálního OMP obsahujícího konzervované smyčky exponované na povrchu. Smyčky exponované na povrchu bakterií *H. influenzae* P2 a P5 jsou výhodnými příklady proteinů, které by mohly být touto metodou transformovány do křížově reaktivních antigenů.

I zde platí, že výhodným způsobem provádění tohoto konstrukčního procesu je homologní rekombinace.

Způsob b) - Dodání promotoru a modulace

Další provedení vynálezu se týká modifikace prostředku založeného na váčcích změnou regulační oblasti *in situ* řídící expresi genu nebo genů a/nebo operonu nebo operonů, o které jde. Tato změna může zahrnovat částečnou nebo úplnou náhradu endogenního promotoru řídícího expresi sledovaného genu za promotor poskytující určitou transkripční aktivitu. Tato odlišná transkripční aktivita může být propůjčena variantami (bodovými mutacemi, delecemi a/nebo inzercemi) endogenních řídících oblastí, přirozeně se vyskytujícími nebo modifikovanými heterologními promotory nebo kombinací obou. Tyto změny obvykle poskytnou silnější transkripční aktivitu než je endogenní aktivita (zavedení silného promotoru), což vede ke zvýšené expresi genu nebo genů/operonu nebo operonů, které jsou sledovány (regulace ke zvýšení exprese). Takový způsob je zvláště užitečný pro zvýšení produkce imunologicky relevantních složek váčků, jako jsou proteiny vnější membrány a lipoproteiny (často konzervované proteiny OMP, obvykle přítomné ve váčcích v nižších koncentracích).

Typické silné promotory, které mohou být integrovány do bakterie *Neisseria*, jsou *porA* [SEQ ID NO: 24], *porB* [SEQ ID NO: 26], *lgtF*, *Opa*, *p110*, *Ist*, a *hpuAB*. Jako konstitutivní, silné promotory jsou výhodné *PorA* a *PorB*. Bylo zjištěno (příklad 9), že aktivita promotoru *PorB* je obsažena ve fragmentu odpovídajícím nukleotidům -1 až -250 proti směru transkripce iniciačního kodonu *porB*. V bakteriích *Moraxella* je výhodné používat promotory *ompH*, *ompG*, *ompE*, *OmpB1*, *ompB2*, *ompA*, *OMPCD* a *Omp106*, a v *H. influenzae* je výhodné integrovat promotory *P2*, *P4*, *P1*, *P5* a *P6*.

S použitím výhodné technologie homologních rekombinací typu dvojitý crossing-over pro zavedení promotoru do oblasti 1000 bp proti směru transkripce mohou být promotory vloženy pro dosažení řízení ke zvýšení exprese kamkoli proti směru transkripce od 30 až 970 bp vzhledem k iniciačnímu kodonu genu. Ačkoli se běžně uvádí, že promotorová oblast by měla být relativně blízko k otevřenému čtecímu rámci pro dosažení optimální exprese genu, autoři předkládaného vynálezu překvapivě zjistili, že umístění promotoru dále od iniciačního kodonu vede k velkému zvýšení úrovně exprese. Je tedy výhodné, jestliže je promotor vložen do vzdálenosti 200 až 600 bp od iniciačního kodonu genu, výhodněji 300 až 500 bp, a nejvýhodněji přibližně 400 bp od iniciačního kodonu ATG.

Způsob c) - Složky váčků produkované podmíněčně

Expresе některých genů kódujících určité složky váčků je pečlivě řízena. Produkce těchto složek je podmíněčně modulována a závisí na různých metabolických signálech a/nebo signálech okolního prostředí. Mezi tyto signály patří například limitace železem, modulace redoxního potenciálu, změny pH a teploty a změny výživy. Některé příklady složek váčků, o kterých je známo, že jsou produkovány podmíněčně, zahrnují proteiny vnější membrány regulované železem, bakterií *Neisseria* a *Moraxella* (například *TbpB*, *LbpB*), a substrátem

indukovatelné poriny vnější membrány. Předkládaný vynález zahrnuje použití genetických metod popisovaných výše (způsob a) nebo b)), pro zajištění konstitutivní exprese těchto molekul. V tomto případě je možno předejít vlivu signálů okolního prostředí na expresi sledovaného genu nebo genů modifikací/náhradou odpovídající řídicí oblasti genu tak, že se stane aktivní konstitutivně (například delecí části (s výhodou veškeré) sekvence odpovídající za represivní kontrolu - například oblasti operátoru), nebo vložení konstitutivního silného promotoru. Pro geny regulované železem může být odstraněn operátor *fur*. Alternativně může být použit způsob i) pro dodání další kopie sledovaného genu/operonu do chromosomu, který je uměle vložen do oblasti spadající pod řízení konstitutivního promotoru.

Způsoby d) a e) - Detoxifikace LPS

Toxicita vakcín založených na váčcích představuje jeden z největších problémů při použití váčků ve vakcínách. Další provedení vynálezu se týká způsobů genetické detoxifikace LPS přítomných ve váčcích. Primární složkou LPS, odpovědnou za aktivaci buněk, je lipid A. Mnoho mutací v genech, které se účastní této biochemické cesty, vedlo k esenciálním fenotypům. Mutace genů odpovědných za konečné kroky modifikace však vedly k teplotně senzitivním (*htrB*) nebo permissivním (*msbB*) fenotypům. Mutace vedoucí ke snížené (nebo žádné) expresi těchto genů vedou ke změně toxické aktivity lipidu A. Nelauroylovaný (mutant *htrB*) nebo nemyristoylovaný (mutant *msbB*) lipid A jsou ovšem méně toxické než lipid A standardního typu. Mutace kódující gen lipid A 4'-kinázy (*lpxK*) rovněž snižuje toxickou aktivitu lipidu A.

Způsob d) tedy zahrnuje buď delecí části (nebo s výhodou veškerého) jednoho nebo více z výše uvedených čtecích rámců nebo promotorů. Alternativně by mohly být promotory nahrazeny slabšími promotory. Pro provádění těchto postupů se s výhodou používají výše

popsané techniky homologní rekombinace. K tomuto účelu se navíc poskytují sekvence *htrB* a *msbB* genů *Neisseria meningitidis* B, *Moraxella catarrhalis* a *Haemophilus influenzae*.

Toxická aktivita LPS by mohla být také změněna zavedením mutací v genech/místech, které se účastní rezistence na polymyxin B (bylo zjištěno, že tato rezistence koreluje s přidáním aminoarabinózy na 4'-fosfát lipidu A). Tyto geny/místa by mohly být *pmrE*, který kóduje UDP-glukózádehydrogenázu, nebo oblast genů pro rezistenci na antibakteriální peptidy společná mnoha enterobakteriím, které by se mohly účastnit při syntéze a přenosu aminoarabinózy. Gen *pmrF*, který je v této oblasti přítomen, kóduje dolikol-fosfátmanosyltransferázu (Gunn J. S., Kheng, B. L., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S. I. 1998, Mol. Microbiol. 27: 1171 - 1182).

Mutace v regulačním systému PhoP-PhoQ, což je dvojsložkový regulační systém s přenosem fosforu (konstitutivní fenotyp PhoP, PhoP^c), nebo kultivační podmínky s nízkým obsahem iontů Mg⁺⁺ (které aktivují regulační systém PhoP-PhoQ) vedly k přidání aminoarabinózy na 4'-fosfát a náhradě myristátu 2-hydroxymyristátem (hydroxylace myristátu). Takto modifikovaný lipid A má sníženou schopnost stimulovat expresi E-selektinu lidskými endoteliálními buňkami a sekreci TNF-α lidskými monocyty.

Způsob e) zahrnuje regulaci těchto genů ke zvýšení exprese s využitím výše popsané strategie (zahrnují silných promotorů, s výhodou se postup provádí s použitím technik homologní rekombinace).

Alternativně by mohl být namísto provádění takovýchto mutací jako kmen pro produkci vakcín použit kmen rezistentní na polymyxin B (spolu s jedním nebo více dalšími způsoby podle vynálezu), protože váčky z těchto kmenů mají rovněž sníženou toxicitu LPS (například jak je ukázáno pro meningokok - van der Ley, P., Hamstra, H. J., Kramer, M., Steeghs, L., Petrov, A. a Poolman, J. T. 1994, v: Proceedings of

the ninth international pathogenic Neisseria conference. The Guildhall, Winchester, England).

Jako další alternativa (a další provedení vynálezu) poskytují autoři vynálezu způsob detoxifikace gramnegativního bakteriálního kmene, který zahrnuje krok kultivace kmene v růstovém médiu obsahujícím 0,1 mg až 100 g aminoarabinózy na litr média.

Jako ještě další alternativa mohou být přidány k prostředku založenému na váčcích syntetické peptidy, které napodobují vazebnou aktivitu polymyxinu B (popsáno níže), aby se dosáhlo snížení toxické aktivity LPS (Rustici, A., Velucchi, M., Faggioni, R., Sironi, M., Ghezzi, P., Quataert, S., Green, B. a Porro M., 1993, Science 259: 361 - 365; Velucchi, M., Rustici, A., Meazza, C., Villa, P., Ghezzi, P. a Porro, M., 1997, J. Endotox. Res. 4:).

Způsob f) - Zakotvení homologních nebo heterologních proteinů do váčků vnější membrány při snížení toxicity LPS

Další provedení předkládaného vynálezu zahrnuje použití genetických sekvencí kódujících peptidy polymyxinu B (nebo jeho analogy) jako prostředky pro směřování fúzních proteinů k vnější membráně. Polymyxin B je cyklický peptid složený z aminokyselin nekódovaných tRNA (produkovaný grampozitivními aktinomycetami), který se velmi silně váže na část lipidů A LPS přítomného ve vnější membráně. Tato vazba snižuje vlastní toxicitu LPS (endotoxinová aktivita). Peptidy napodobující strukturu polymyxinu B a složené z kanonických (kódovaných tRNA) aminokyselin byly vyvinuty a vážou se také se silnou aktivitou na lipid A. Tyto peptidy se používají pro detoxifikaci LPS. Bylo zjištěno, že jeden z těchto peptidů známý jako SAEP-2 (N-konec-Lys-Thr-Lys-Cys-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Cys-C-konec) je z tohoto hlediska velmi slibný (Molecular Mapping and detoxifying of the Lipid A binding site by synthetic peptides, 1993),

Rustici, A., Velucchi, M., Faggioni, R., Sironi, M., Ghezzi, P., Quataert, S., Green, B. a M. Porro, *Science* 259, 361 - 365).

Způsob f) podle vynálezu poskytuje zlepšení tohoto použití. Bylo zjištěno, že použití sekvencí DNA kódujících peptid SEAP-2 (nebo jeho deriváty), fúzovaný geneticky ke sledovanému genu (kódující například T-buněčný antigen nebo ochranný antigen, který je obvykle sekrenován jako je toxin, nebo cytosolový nebo periplasmatický protein) je prostředek pro směřování odpovídajícího rekombinantního proteinu do vnější membrány výhodného bakteriálního hostitele (přičemž současně snižuje toxicitu LPS).

Tento systém je vhodný pro labilní proteiny, které by nebyly přímo vystaveny na vnější straně váčků. Váček by proto sloužil jako dodávací vehikulum, které by vystavilo protein imunitnímu systému, jakmile by váčky byly obklopeny T-buňkami. Alternativně by genetická fúze měla také obsahovat signální peptid nebo transmembránovou doménu tak, že rekombinantní protein by mohl procházet vnější membránou pro expozici imunitnímu systému hostitele.

Tato strategie směřování (targeting) by mohla být zvláště zajímavá v případě genů kódujících proteiny, které jsou normálně směřovány do vnější membrány. Tato metodologie také umožňuje izolaci rekombinantních váčků obohacených na sledovaný protein. S výhodou takový signál směřující peptid umožňuje obohacení váčků vnější membrány na jeden nebo několik zajímavých proteinů, které se obvykle v dané subcelulární lokalizaci nenalézají. Nevyčerpávající seznam bakterií, které mohou být použity jako příjemci - hostitelé takovéto produkce rekombinantních váčků zahrnují *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia pneumoniae*.

I když je výhodné, aby byl gen konstruktu konstrukčně zahrnut do chromosomu bakterie (použitím způsobu i), v alternativním

výhodném provedení je možno vyrábět rekombinantní proteiny označené SAEP-2 nezávisle a navázat je k prostředku založenému na váčkách v pozdějším stupni.

Další provedení je použití těchto konstruktů při způsobu čištění proteinu. Tento systém by mohl být použit jako součást expresního systému pro produkci rekombinantních proteinů obecně. Peptidová značka SAEP-2 může být použita pro afinitní čištění proteinu, na kterém je navázána, použitím kolony obsahující imobilizované molekuly lipidu A.

Způsob h) - Polysacharidy s křížovou reaktivitou

Izolace váčků bakteriální vnější membrány ze zapouzdřených gramnegativních bakterií často vede ke společnému čištění polysacharidu obalu. V některých případech může být tento „kontaminující“ materiál užitečný, protože polysacharid může zesilovat imunitní odpověď vyvolanou jinými složkami váčku. V jiných případech však může být přítomnost kontaminujícího polysacharidového materiálu v prostředcích založených na váčkách škodlivá pro použití váčků ve vakcíně. Bylo například ukázáno v alespoň jednom případě *N. meningitidis*, že polysacharid pouzdra séroskupiny B neposkytuje ochrannou imunitu a má sklon indukovat nepříznivou autoimunitní odpověď u lidí. Způsob h) podle vynálezu tedy provádí konstrukci bakteriálního kmene pro produkci váčků tak, že neobsahuje polysacharid pouzdra. Váčky potom budou vhodné pro použití u lidí. Zvláště výhodný příklad takového prostředku založeného na váčkách je prostředek z *N. meningitidis* séroskupiny B zbavený polysacharidu pouzdra.

Toho je možno dosáhnout použitím modifikovaných kmenů produkujících váčky, ve kterých byly vyřazeny geny nezbytné pro biosyntézu a/nebo export obalu. Inaktivace genu kódujícího biosyntézu nebo export obalového polysacharidu může být dosažena mutací

(bodová mutace, delece nebo inserce) buď kontrolní oblasti, kódující oblasti nebo obou (s výhodou použitím výše popsaných technik homologní rekombinace). Navíc může být inaktivace genů pro biosyntézu obalu dosažena také nadměrnou expresí antikódující molekuly nebo transposonovou mutagenezí. Výhodný způsob je vyjmutí některého nebo všech genů *cps* a *Neisseria meningitidis* nezbytných pro biosyntézu a export polysacharidu. K tomuto účelu může být použit náhradní plasmid pMF121 (popsaný ve Frosh a další, 1990, Mol. Microbiol. 4: 1215 - 1218) pro dodání mutace, která způsobí deleci shluku genů *cpsCAD* (+ *galE*). Alternativně by mohl být vypuštěn gen *siaD*, nebo by mohla být snížena jeho exprese (meningokokový gen *siaD* kóduje alfa-2,3-sialyltransferázu, což je enzym nutný pro syntézu obalového polysacharidu a LOS). Tyto mutace mohou také odstranit struktury podobné hostitelským na sacharidové části LPS bakterie.

Způsob i) - dodání jedné nebo více dalších kopií genu a/nebo operonu do hostitelského chromosomu, nebo dodání heterologního genu a/nebo operonu do hostitelského chromosomu

Účinná strategie pro modulaci složení prostředí založeného na váčcích je dodání jedné nebo více kopií segmentu DNA obsahujícího expresní kazetu do genomu gramnegativní bakterie. Nevyčerpávající seznam výhodných druhů bakterií, které by mohly být použity jako příjemci takové kazety, zahrnuje *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*. Gen nebo geny obsažené v expresní kazetě mohou být homologní (nebo endogenní) (tj. existují přirozeně v genomu manipulované bakterie) nebo heterologní (tj. přirozeně se v genomu manipulované bakterie nevyskytují). Znovu zavedená expresní kazeta se může skládat z nemodifikovaných, „přírodních“ sekvencí

promotor/gen/operon, nebo zkonstruovaných expresních kazet, ve kterých byla změněna promotorová oblast a/nebo kódující oblast nebo obě tyto oblasti. Nevyčerpávající seznam výhodných promotorů, které by mohly být použity pro expresi, zahrnuje promotory *porA*, *porB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *lst*, *hpuAB* z *N. meningitidis* nebo *N. gonorrhoeae*, promotory *p2*, *p5*, *p4*, *ompF*, *pl*, *ompH*, *p6*, *hin47* z *H. influenzae*, promotory *ompH*, *ompG*, *ompCD*, *ompE*, *ompB1*, *ompB2*, *ompA* z *M. catarrhalis*, promotor λ pL, *lac*, *tac*, *araB* z *Escherichia coli* nebo promotory specificky rozpoznávané RNA polymerázou bakteriofágů, jako je bakteriofát T7 *E. coli*. Nevyčerpávající seznam výhodných genů, které by mohly být v takovém systému exprimovány, zahrnuje *Neisseria* NspA, Omp85, PilQ, TbpA/B komplex, Hsf, PldA, HasR; *Chlamydia* MOMP, HMWP; *Moraxella* OMP106, HasR, PilQ, OMP85, PldA; *Bordetella pertussis* FHA, PRN, PT.

Ve výhodném provedení vynálezu je expresní kazeta dodaná a integrovaná do bakteriálního chromosomu pomocí homologní a/nebo místně specifické rekombinace. Integrační vektory použité pro dodání těchto genů a/nebo operonů mohou být podmíněčně replikativní nebo „suicide“ plasmidy, bakteriofágy, transposony nebo fragmenty přímé DNA získané restriční hydrolýzou nebo amplifikací PCR. Integrace se s výhodou směřuje do chromosomálních oblastí postradatelných pro růst *in vitro*. Nevyčerpávající seznam výhodných míst, která mohou být použita pro směřování integrace DNA, zahrnují geny *porA*, *porB*, *opa*, *opc*, *rmp*, *omp26*, *lecA*, *cps*, *lgtB* *Neisseria meningitidis* a *Neisseria gonorrhoeae*, geny *P1*, *P5*, *hmw1/2*, *IgA* protázy, *fimE* z NTHi; geny *lecA1*, *lecA2*, *omp106*, *uspA1*, *uspA2* *Moraxella catarrhalis*. Expresní kazeta použitá pro modulaci exprese složky nebo složek váčků může být alternativně do zvolené bakterie dodána pomocí episomálních vektorů, jako jsou kruhové/přímé replikativní plasmidy, kosmidy, fágmidy, lysogenní bakteriofágy nebo bakteriální umělé chromosomy. Selektce rekombinační události může být provedena pomocí genetického markeru umožňujícího selekci, jako jsou geny propůjčující

rezistenci na antibiotika (například kanamycin, erythromycin, chloramfenikol nebo gentamycin), geny propůjčující rezistenci na těžké kovy a/nebo toxické sloučeniny, nebo geny kompenzující auxotrofní mutace (například *pur*, *leu*, *met*, *aro*).

Heterologní geny - exprese cizích proteinů ve váčcích vnější membrány

Váčky vnější membrány bakterií představují velmi přitažlivý systém pro produkci, izolaci a dodávání rekombinantních proteinů pro vakcíny, terapeutická a/nebo diagnostická použití. Další provedení tohoto vynálezu se týká exprese, produkce a směřování cizích, heterologních proteinů do vnější membrány, a použití bakterií pro produkci rekombinantních váčků.

Výhodný způsob pro dosažení tohoto cíle je způsob zahrnující následující kroky: zahrnutí heterologního genu, popřípadě řízeného silnou promotorovou sekvencí, do chromosomu gramnegativního kmene homologní rekombinací. Z výsledného modifikovaného kmene mohou být vyrobeny váčky.

Nevyčerpávající seznam bakterií, které mohou být použity jako příjemci - hostitelé pro produkci rekombinantních váčků, zahrnuje *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*. Gen exprimovaný v takovém systému může být virového, bakteriálního, houbového nebo parazitického původu, nebo může pocházet z eukaryotického organismu.

Výhodné použití vynálezu zahrnuje způsob exprese proteinů vnější membrány *Moraxella*, *Haemophilus* a/nebo *Pseudomonas* (integrálních, polytopických a/nebo lipoproteinů) v rekombinantních váčcích *Neisseria meningitidis*. Výhodná místa integrace jsou uvedena

výše a geny, které mohou být s výhodou zaváděny, jsou geny poskytující ochranu proti bakterii, ze které byly izolovány. Výhodné ochranné geny pro každou bakterii se popisují dále.

Další výhodná použití jsou: váčky vyrobené z modifikovaného kmene *Haemophilus influenzae*, kde heterologní kmen je ochranný OMP z *Moraxella catarrhalis*; a váčky vyrobené z modifikovaného kmene *Moraxella catarrhalis*, kde heterologní gen je ochranný OMP z *Haemophilus influenzae* (výhodná místa pro vložení genu jsou uvedena výše a výhodné ochranné antigeny se popisují dále).

Zvláště výhodné použití tohoto provedení je v oblasti prevence nebo léčení sexuálně přenášených nemocí (STDs, sexually-transmitted diseases). Pro praktické lékaře je často obtížné zjistit, zda je hlavní příčinou STD infekce gonokokem nebo *Chlamydia trachomatis*. Tyto dva organismy jsou hlavní příčinou salpingitidy - onemocnění, které může vést ke sterilitě hostitele. Bylo by proto vhodné, pokud by mohla být prováděna vakcínace nebo léčení STD kombinovanou vakcínou účinnou proti onemocnění způsobenému oběma organismy. Bylo ukázáno, že cílem ochranných protilátek je hlavní protein vnější membrány (major outer membrane protein, MOMP) *C. trachomatis*. Pro indukci těchto protilátek je však důležitá strukturní integrita tohoto integrálního membránového proteinu. Navíc jsou epitopy rozpoznávané těmito protilátkami variabilní a definují více než deset sérologických variant. Výše popsané provedení předkládaného vynálezu umožňuje uspořádání jednoho nebo více membránových proteinů v rámci prostředku založeného na váčkách vnější membrány do správné konformace. Zkonstruování gonokokového kmene exprimujícího větší počet sérologických variant MOMP *C. trachomatis* ve vnější membráně a produkce váček tímto kmenem poskytne jediné řešení pro více problémů se správným uspořádáním membránových proteinů, předkládání dostatečného počtu sérologických variant MOMP pro ochranu proti širokému spektru sérologických variant a současnou prevencí/léčením gonokokové

infekce (důsledkem je, že ošetřující lékař nemusí na počátku rozhodnout, který organismus je příčinou konkrétních klinických příznaků - proti oběma organismům se může vakcinovat současně, což umožňuje léčení STD ve velmi časném stadiu). Výhodná místa pro vložení genů do gonokokového chromosomu se uvádějí výše. Další výhodné geny s ochrannými účinky proti *C. trachomatis*, které by mohly být rovněž zahrnuty, jsou HMWP, PmpG a proteiny OMP popisované ve WO 99/28475.

Směrování heterologních proteinů

Exprese některých heterologních proteinů v bakteriálních váčkách může vyžadovat přidavek směrovacího signálu nebo signálů vnější membrány. Výhodný způsob pro vyřešení tohoto problému je vytvoření genetické fúze mezi heterologním genem a genem kódujícím přítomný OMP, jako specifický přístup ke směrování rekombinantních proteinů do váčků. Nejvýhodnější je, pokud je heterologní gen fúzován k signálním peptidovým sekvencím, jako je OMP.

Prostředky založené na váčkách neisserií

Pro regulaci ke zvýšení exprese prostřednictvím způsobů b) a/nebo i) je výhodný jeden nebo více následujících genů (kódujících ochranné antigeny), jestliže se způsoby provádějí na kmenu neisserií, včetně gonokoku a meningokoku (zvláště *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/EP99/05989), lipo02 (PCT/EP99/08315), Tbp2 (WO 99/57280), MitA (WO 99/57280), a ctrA

(PCT/EP00/00135). Ty jsou také výhodné jako geny, které mohou být heterologně zavedeny do jiných gramnegativních bakterií.

Pro regulaci ke snížení exprese způsobem a) je vhodný jeden nebo více následujících genů: PorA, PorB, PilC, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, Opa a Opc.

Pro regulaci ke snížení exprese způsobem d) je výhodný jeden nebo více z následujících genů: htrB, msbB a lpxK.

Pro regulaci ke zvýšení exprese způsobem e) je výhodný jeden nebo více z následujících genů: pmrA, pmrB, pmrE a pmrF.

Výhodné represivní kontrolní sekvence pro způsob c) jsou: operátorová oblast *fur* (konkrétně pro jeden nebo oba geny TbpB nebo LbpB); a operátorová oblast DtxR.

Pro regulaci ke snížení exprese způsobem h) je výhodný jeden nebo více z následujících genů: galE, siaA, siaB, siaC, siaD, ctrA, ctrB, ctrC a ctrD.

Prostředky založené na váčcích *Pseudomonas aeruginosa*

Pro regulaci ke zvýšení exprese způsobem b) a/nebo i) je výhodný jeden nebo více z následujících genů (kódujících ochranné antigeny): PcrV, OprF, OprI. Ty jsou také výhodné jako geny, které mohou být heterologně zaváděny do jiných gramnegativních bakterií.

Prostředky založené na váčcích *Moraxella catarrhalis*

Pro regulaci ke zvýšení exprese způsobem b) a/nebo i) je vhodný jeden nebo více z následujících genů (kódujících ochranné antigeny): OMP106 (WO 97/41731 a 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 M. E., a další (1993) Infect. Immun. 61: 2003 - 2010), D15 (PCT/EP99/03822), OmpIA1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), LbpA a LbpB (WO 98/55606), TbpA a TbpB (WO 97/13785 a WO 97/32980), OmpE, UspA1 a UspA2 (WO 93/03761), a Omp21. Tyto geny jsou také výhodné jako geny, které mohou být heterologně zavedeny do jiných gramnegativních bakterií.

Pro regulaci ke snížení exprese způsobem a) je vhodný jeden nebo více z následujících genů: CopB, OMP106, OmpB1, TbpA, TbpB, LbpA a LbpB.

Pro regulaci ke snížení exprese způsobem d) je vhodný jeden nebo více z následujících genů: htrB, msbB a lpxK.

Pro regulaci ke zvýšení exprese způsobem e) je výhodný jeden nebo více z následujících genů: pmrA, pmrB, pmrE a pmrF.

Prostředky založené na váčcích *Haemophilus influenzae*

Pro regulaci ke zvýšení exprese způsobem b) a/nebo i) je vhodný jeden nebo více z následujících genů (kódujících ochranné antigeny): 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, a Hif (všechny geny v tomto operonu mohou být regulovány směrem ke zvýšení exprese pro dosažení zvýšené exprese pilinu). Tyto geny jsou také výhodné jako geny, které mohou být heterologně zavedeny do jiných gramnegativních bakterií.

Pro regulaci ke snížení exprese způsobem a) je výhodný jeden nebo více z následujících genů: P2, P5, Hif, IgA1-proteáza, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, TbpA, a TbpB.

Pro regulaci ke snížení exprese způsobem d) je vhodný jeden nebo více z následujících genů: htrB, msbB a lpxK.

Pro regulaci ke zvýšení exprese způsobem e) je výhodný jeden nebo více z následujících genů : pmrA, pmrB, pmrE a pmrF.

Vakcíny

Výhodné provedení vynálezu je formulace prostředků založených na váčcích podle vynálezu do vakcíny, která může také obsahovat farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.

Výroba prostředků založených na váčcích z jakéhokoli z výše uvedených modifikovaných kmenů může být dosažena jakýmkoli způsobem známým odborníkům v oboru. S výhodou se používají způsoby popisované v EP 301992, US 5,597,572, EP 11243 nebo US 4,271,147. nejvýhodněji se popisuje způsob popsáný v příkladu 8.

Vakcína se obecně popisuje v publikaci Vaccine Design („The subunit and adjuvant approach! (ed. Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York).

Prostředky založené na váčcích podle předkládaného vynálezu mohou být smíseny s adjuvans ve vakcíně podle vynálezu. Mezi vhodná adjuvans patří sůl hliníku jako je gel hydroxidu hlinitého (alum) nebo fosforečnan hlinitý, ale může být také použita sůl vápníku (zvláště uhličitan vápenatý, železa nebo zinku, nebo se může použít nerozpustná suspenze acylovaného tyrosinu nebo acylovaných cukrů, kationtově nebo aniontově derivatizovaných polysacharidů nebo polyfosfazenů.

Vhodný adjuvantní systém pro Th1 může být například monofosforyllipid A, zvláště 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A, a kombinace monofosforyllipidu A, s výhodou 3-de-O-acylovaného monofosforyllipidu A (3D-MPL) spolu se solí hliníku. Vylepšený systém zahrnuje kombinaci monofosforyllipidu A a saponinového derivátu, zvláště v kombinaci QS21 a 3D-MPL, jak se popisuje ve WO 94/00153, nebo méně reaktogenní směs, kde QS21 se blokuje

cholesterolem, jak se popisuje ve WO 96/33739. Zvláště silný adjuvantní prostředek obsahující QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi typu olej ve vodě, se popisuje ve WO 95/17210 a jde o výhodnou formulaci.

Vakcína může obsahovat saponin, výhodněji QS21. Může také obsahovat emulzi typu olej ve vodě a tokoferol. Výhodnými induktory odpovědi TH1 jsou také nemethylované oligonukleotidy obsahující CpG (WO 96/02555), které jsou vhodné pro použití v rámci předkládaného vynálezu.

Vakcína podle předkládaného vynálezu může být použita pro ochranu nebo léčení savce vnímavého k infekci podáváním uvedené vakcíny systémově nebo přes sliznice. Podání může například probíhat injekcí intramuskulární, intraperitoneální, intradermální nebo subkutánní cestou; nebo přes sliznice orálně/alimentárního, respiračního nebo urogenitálního traktu. Jedno provedení předkládaného vynálezu je tedy způsob imunizace hostitele proti onemocnění způsobenému gramnegativní bakterií, kde tento způsob zahrnuje podávání imunoprotektivní dávky prostředku založeného na váčcích podle předkládaného vynálezu hostiteli.

Množství antigenu v každé dávce vakcíny se volí jako množství, které indukuje v typických vakcínách imunoprotektivní odpověď bez významných nepříznivých vedlejších účinků. Toto množství se bude lišit v závislosti na tom, jaký konkrétní imunogen se použije a jakým způsobem se předkládá. Obecně se očekává, že každá dávka bude obsahovat 1 až 100 µg proteinového antigenu, s výhodou 5 až 50 µg, a nejnepříčetněji v rozmezí 5 až 25 µg.

Optimální množství určité vakcíny může být zjištěno standardními studiemi, které zahrnují pozorování příslušných imunitních odpovědí u pacientů. Po počáteční vakcínaci mohou pacienti dostat ve vhodných intervalech jednu nebo více zesilujících imunizací.

Vakcíny z prázdných buněk nebo vakcíny z usmrcených celých buněk

Autoři vynálezu ukazují, že výše popsaná zlepšení prostředků a vakcín založených na váčcích mohou být snadno rozšířena na preparáty z prázdných buněk (typu „ghost“) nebo prostředky obsahující usmrcené celé buňky (se stejnými výhodami). Modifikované gramnegativní kmeny podle vynálezu, ze kterých se prostředky založené na váčcích připravují, mohou být také použity pro výrobu prostředků typu „ghost“ a prostředků obsahujících usmrcené celé buňky. Způsoby výroby prostředků typu „ghost“ (prázdné buňky s intaktními obaly) z gramnegativních kmenů jsou v oboru dobře známe (viz například WO 92/01791). Způsoby usmrcování úplných buněk pro výrobu inaktivovaných buněčných prostředků pro použití ve vakcínách jsou také dobře známe. Termíny „prostředky založené na váčcích“ a „vakcíny založené na váčcích“, stejně jako způsoby popisované v předkládaném dokumentu, jsou proto použitelné pro účely tohoto vynálezu na termíny „prostředek typu ghost“ a „vakcína typu ghost“ a „prostředek založený na usmrcených úplných buňkách“ a „vakcína založená na usmrcených úplných buňkách“.

Kombinace způsobů a) až i)

Může být vhodné, jestliže se pro přípravu modifikovaného kmenu, ze kterého se připravují zlepšené prostředky založené na váčcích podle vynálezu, používá jeden nebo více z výše uvedených způsobů. S výhodou se používá jeden takový způsob, výhodněji dva nebo více (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 nebo 9) způsobů, pro výrobu vakcíny založené na váčcích. Protože se při výrobě vakcíny založené na váčcích používá každý další způsob, každé zlepšení spolupracuje s dalšími způsoby použitými pro přípravu optimalizovaných zkonstruovaných prostředků založených na váčcích.

Výhodný prostředek založený na váčcích meningokoků (zvláště *N. meningitidis B*) zahrnuje použití způsobů a), b), d) a/nebo e), a h). Tyto prostředky založené na váčcích jsou bezpečné (neobsahují struktury podobné strukturám hostitele), netoxické a strukturované tak, že imunitní odpověď hostitele se bude soustředit na vysoké hladiny ochranných (a s výhodou konzervovaných) antigenů. Všechny výše uvedené prvky spolupracují pro poskytnutí optimalizované vakcíny založené na váčcích.

Podobně pro *M. catarrhalis* a netypovatelný *H. influenzae*, zahrnují výhodné prostředky založené na váčcích použití způsobů a), b), a d) a/nebo e).

Další provedení vynálezu je tedy imunoprotektivní a netoxická vakcína založená na gramnegativních váčcích, prázdné buňce (ghost) nebo usmrcené celé buňce, vhodná pro pediatrické použití.

Pod pediatrickým použitím se míní použití u dětí mladších než čtyři roky.

Imunoprotektivním účinkem se míní, že u alespoň 40 % (a s výhodou 50, 60, 70, 80, 90 a 100 %) dětí dojde k sérokonverzi (čtyřnásobné zvýšení baktericidní aktivity, tj. ředění antiséra, při kterém zahyne 50 % bakterií - viz například PCT/EP98/05117) proti souboru heterologních kmenů zvolených z hlavních známých skupin klonů. Pro meningokoky B by měly mít tyto kmeny odlišný typ PorA, než má kmen produkující váčky, a měly by s výhodou zahrnovat 2, 3, 4 nebo nejvýhodněji všech pět kmenů H44/76, M97/252078, BZ10, NGP165 a CU385. Pro netypovatelný *H. influenzae*, by měly tyto kmeny zahrnovat s výhodou 2, 3, 4 nebo nejvýhodněji všech pět kmenů 3224A, 3219C, 3241A, 640645, a A840177. V případě *M. catarrhalis* by měly tyto kmeny s výhodou zahrnovat 2, 3, 4 nebo nejvýhodněji všech pět jmenů ATCC 43617, 14, 358, 216 a 2926.

Pod pojmem netoxický se míní, že dojde k podstatnému (dvou až čtyřnásobnému, s výhodou desetinásobnému) snížení aktivity endotoxinů, měřeno známými testy LAL a pyrogenicity.

Kombinace vakcín

Další provedení vynálezu jsou kombinace vakcín obsahující prostředky založené na váčcích podle vynálezu s jinými antigeny, které se s výhodou používají proti určitým stavům onemocnění. Bylo zjištěno, že váčky jsou zvláště vhodné pro formulaci s jinými antigeny, protože mají s výhodou adjuvantní účinek na antigeny, se kterými se mísí.

V jednom výhodném provedení se prostředky založené na váčcích meningokoku B podle vynálezu formulují s 1, 2, 3 nebo s výhodou všemi čtyřmi z následujících meningokokových kapsulárních polysacharidů, které mohou být samotné nebo konjugované k proteinovému nosiči: A, C, Y nebo W. Taková vakcína může být s výhodou použita jako globální vakcína proti meningokokům. Spíše než použití prostředků založených na váčcích meningokoka B podle vynálezu je také zřejmé, že formulace by mohla alternativně obsahovat prostředky založené na váčcích meningokoka B standardního typu dvou nebo více (s výhodou několika) kmenů náležejících k několika subtypům/sérotypům (například zvolené z P1.15, P1.7,16, P1.4 a P1.2).

V dalším výhodném provedení se prostředky založené na váčcích meningokoka B podle vynálezu (nebo výše uvedená směs dvou nebo více prostředků založených na váčcích meningokoka B standardního typu) s výhodou formulované s 1, 2, 3 nebo všemi čtyřmi prostými nebo konjugovanými polysacharidy obalu meningokoka A, C, Y nebo W, formulují s konjugovaným polysacharidem obalu *H. influenzae* b a jedním nebo více prostými nebo konjugovanými obalovými polysacharidy pneumokoků. Vakcína může také popřípadě

obsahovat jeden nebo více proteinových antigenů, které chrání hostitele proti infekci *Streptococcus pneumoniae*. Taková vakcína může být s výhodou používána jako globální vakcína proti meningitidě.

Antigeny obalových polysacharidů pneumokoků se s výhodou volí ze sérotypů 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F (nejvýhodněji ze sérotypů 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F a 23F).

Výhodné proteinové antigeny pneumokoků jsou takové proteiny pneumokoků, které jsou vystaveny na vnějším povrchu pneumokoků (schopné být rozpoznávány imunitním systémem hostitele během alespoň části životního cyklu pneumokoka), nebo jde o proteiny, které jsou vylučovány nebo uvolňovány pneumokokem. Nejvýhodněji je proteinem toxin, adhesin, dvousložkový přenašeč signálu nebo lipoprotein *Streptococcus pneumoniae*, nebo jeho fragmenty. Mezi zvláště výhodné proteiny patří bez omezení: pneumolysin (s výhodou detoxifikovaný chemickým působením nebo mutací) (Mitchell a další, *Nucleic Acids Res.* 11. červenec 1990, 18 (13): 4010 „Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2“, Mitchell a další, *Biochim. Biophys. Acta*, 23. ledna 1989, 1007 (1):67 - 72, „Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties“, WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton a další), WO 99/03884 (NAVA); PspA a jeho transmembránové deleční varianty (US 5804193 - Briles a další); PspC a jeho transmembránové deleční varianty (WO 97/09994 - Briles a další); PsaA a jeho transmembránové deleční varianty (Berry & Paton, *Infect. Immun.* prosinec 1996; 64 (12): 5255 - 62, „Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*“); pneumokokové proteiny vázající se na cholin a jejich transmembránové deleční varianty; CbpA a jeho transmembránové deleční varianty (WO 97/41151; WO 99/51266); glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (*Infect. Immun.* 1996, 64: 3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA

(Sanchez-Beato a další, FEMS Microbiol. Lett. 1998, 164: 207 - 14); protein podobný M, SB patentová přihláška No. EP 0837130; a adhesin 18627, SB patentová přihláška No. EP 0834568. Další výhodné proteinové antigeny pneumokoků jsou antigeny popisované ve WO 98/18931, zvláště ty, které jsou vybrány ve WO 98/18930 a PCT/US 99/30390.

V dalším výhodném provedení se prostředky založené na váčcích *Moraxella catarrhalis* podle vynálezu formulují s jedním nebo více prostými nebo konjugovanými polysacharidy pouzdra pneumokoků a jedním nebo více antigeny, které mohou hostitele chránit proti infekci netypovatelným *H. influenzae*. Vakcína může také popřípadě obsahovat jeden nebo více proteinových antigenů, které mohou hostitele chránit proti infekci *Streptococcus pneumoniae*. Tato vakcína může také popřípadě obsahovat jeden nebo více antigenů, které mohou chránit hostitele proti RSV a/nebo jeden nebo více antigenů, které mohou chránit hostitele proti viru chřipky. Taková vakcína se může s výhodou používat jako globální vakcína proti zánětu středního ucha.

Výhodné proteinové antigeny netypovatelného *H. influenzae* obsahují fimbrinový protein (US 5766608) a fúze obsahující jeho peptidy (např. fúze LB1) (US 5843464 - Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, protein D, TbpA, TbpB, Hia, Hmw1, Hmw2, Hap, a D15.

Mezi výhodné antigeny proti viru chřipky patří úplný, živý nebo inaktivovaný virus, štěpený virus chřipky, pěstovaný ve vejcích nebo buňkách MDCK, nebo buňkách Vero, nebo úplné virosomy chřipky (popisované v R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915 - 920) nebo jejich čištěné nebo rekombinantní proteiny, jako jsou proteiny HA, NP, NA, nebo M nebo jejich kombinace.

Výhodné antigeny RSV (Respiratory Syncytial Virus, virus respiračního syncytia) zahrnují glykoprotein F, glykoprotein G, protein NH nebo jejich deriváty.

V ještě dalším výhodném provedení se formulují prostředky založené na váčcích netypovatelného *H. influenzae* podle vynálezu s jedním nebo více prostými nebo konjugovanými pneumokokovými obalovými polysacharidy a jedním nebo více antigeny, které mohou hostitele chránit proti infekci *M. catarrhalis*. Vakcína může také obsahovat jeden nebo více proteinových antigenů, které mohou hostitele chránit proti infekci *Streptococcus pneumoniae*. Tato vakcína může také popřípadě obsahovat jeden nebo více antigenů, které chrání hostitele proti RSV a/nebo jeden nebo více antigenů, které mohou chránit hostitele proti viru chřipky. Taková vakcína by se s výhodou používala jako globální vakcína proti zánětu středního ucha.

Nukleotidové sekvence podle vynálezu

Další provedení vynálezu se týká poskytnutí nových nukleotidových sekvencí, které mohou být použity při způsobech podle vynálezu. Poskytují se specifické oblasti proti směru transkripce z různých genů z různých kmenů, které mohou být například použity při způsobech a), b), d) a h). Navíc se poskytují kódující oblasti pro provádění způsobu d).

Obečný způsob pro analýzu nekódující okolní oblasti bakteriálního genu a její využití pro modulovanou expresi genu ve váčcích

Nekódující oblasti obklopující specifický gen (flanking regions) obsahují regulační prvky důležité při expresi genu. Tato regulace probíhá jak na úrovni transkripce, tak na úrovni translace. Sekvence z těchto oblastí, buď proti směru transkripce nebo ve směru transkripce vzhledem k otevřenému čtecímu rámci genu, mohou být

získány sekvenováním DNA. Tato sekvenční informace dovolí zjištění potenciálních regulačních motivů, jako jsou různé prvky promotorů, terminační sekvence, indukovatelné prvky sekvence, represory, prvky odpovědné za změnu fáze, Shine-Dalgarnovy sekvence, oblasti s potenciální sekundární strukturou účastnící se regulace, stejně jako další typy regulačních motivů nebo sekvencí.

Tato informace o sekvenci umožní modulaci přirozené exprese sledovaného genu. Regulace exprese genu ke zvýšení exprese může být uskutečněna změnou promotoru, Shine-Dalgarnovy sekvence, potenciálních represerových nebo operátorových prvků, nebo jakýchkoli dalších zúčastněných prvků. Podobně může být dosaženo regulace ke snížení exprese podobnými typy modifikací. Alternativně je možno změnou sekvencí pro variaci fáze zahrnout expresi genu pod řízení variací fáze, nebo může být gen z této regulace vyjmut. V dalším přístupu může být exprese genu vložena pod řízení jednoho nebo více indukovatelných prvků, což umožňuje řízenou expresi. Příklady této regulace zahrnují bez omezení indukci posunem teploty, přidavkem indukujících substrátů jako jsou určité uhlohydráty nebo jejich deriváty, stopové prvky, vitaminy, kofaktory, kovové ionty atd.

Modifikace tak jak se popisují výše mohou být zaváděny několika různými způsoby. Modifikace sekvencí, které se účastní exprese genu, může být prováděna *in vivo* náhodnou mutagenezí následovanou selekcí na požadovaný fenotyp. Další přístup spočívá v izolaci příslušné oblasti a její modifikaci náhodnou mutagenezí, nebo místně specifickou mutagenezí s náhradou, inzercí nebo delecí. Modifikovaná oblast může být potom znovu zavedena do bakteriálního genomu homologní rekombinací a může být zjišťován vliv na expresi genu. Při dalším přístupu může být použita znalost sekvence sledované oblasti pro náhradu nebo vyjmutí všech nebo části přirozených regulačních sekvencí. V takovém případě je regulační oblast izolovaná a modifikovaná tak, aby obsahovala regulační prvky z jiného genu, kombinaci regulačních prvků z jiných genů, syntetickou

regulační oblast nebo jakoukoli jinou regulační oblast, nebo pro delecí vybraných částí regulačních sekvencí standardního typu. Tyto modifikované sekvence mohou být potom vloženy zpět do bakterie prostřednictvím homologní rekombinace do genomu.

Při způsobu b) může být například modulována exprese genu záměnou jeho promotoru za silnější promotor (pomocí izolace sekvence proti směru transkripce vzhledem k tomuto genu, modifikace této sekvence *in vitro* a zpětné zavedení do genomu homologní rekombinací). Zvýšená exprese může být získána jak v bakteriích, tak ve váčcích vnější membrány vylučovaných (nebo vytvářených) bakterií.

V dalších výhodných příkladech mohou být popsány přístupy použité pro tvorbu rekombinantních bakteriálních kmenů se zlepšenými vlastnostmi pro použití ve vakcínách, jak bylo popsáno výše. Tyto varianty mohou být bez omezení oslabené kmeny, kmeny se zvýšenou expresí vybraných antigenů, kmeny se sníženou expresí (knock-out) genů interferujících s imunitní odpovědí a kmeny s modulovanou expresí imunodominantních proteinů

SEQ ID NO: 2-23, 25, 27-38 jsou všechny sekvence *neisserií* uložené proti směru transkripce (upstream) (proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu různých výhodných genů) obsahující vždy přibližně 1000 bp. SEQ ID NO: 39-62 jsou všechny sekvence *M. catarrhalis* uložené proti směru transkripce (proti směru transkripce iniciačního kodonu různých výhodných genů) obsahující přibližně vždy 1000 bp. SEQ ID NO: 63-75 jsou všechny sekvence *H. influenzae* uložené proti směru transkripce (proti směru transkripce iniciačního kodonu různých výhodných genů) obsahující přibližně vždy 1000 bp. Všechny tyto sekvence mohou být použity při genetických metodách, zvláště homologní rekombinaci pro regulaci ke zvýšení nebo snížení exprese otevřených čtecích rámců, se kterými jsou asociovány (jak bylo popsáno výše). SEQ ID NO: 76-81 jsou kódující oblasti pro geny HtrB a MsbB *Neisseria*, *M. catarrhalis* a *Haemophilus influenzae*.

Mohou být použity při genetických metodách (zvláště homologní rekombinaci) pro regulaci ke snížení exprese (zvláště delecí) části (s výhodou všech) těchto genů (způsob d)).

Další provedení vynálezu je tedy izolovaná polynukleotidová sekvence, která hybridizuje za vysoce stringentních podmínek s částí o délce alespoň 30 nukleotidů, která je součástí nukleotidů SEQ ID NO: 2-23, 25, 27-81, nebo jejich komplementárních řetězců. Izolovaná sekvence by měla být s výhodou dostatečně dlouhá pro provedení homologní rekombinace s chromosomální sekvencí, jestliže je částí vhodného vektoru - totiž alespoň 30 nukleotidů (s výhodou alespoň 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 nebo 500 nukleotidů). Izolovaný polynukleotid by měl výhodněji obsahovat alespoň 30 nukleotidů (s výhodou alespoň 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 nebo 500 nukleotidů) SEQ ID NO: 2-23, 25, 27-81 nebo jejich komplementárních řetězců.

Jak se zde používá, hybridizace za vysoce stringentních podmínek probíhá například v roztoku 6 x SSC, 5 x Denhardtův roztok, 0,5% SDS, a 100 µg/ml fragmentované a denaturované DNA lososího spermatu při hybridizaci přes noc při 65 °C s promytím 2 x SSC, 0,1% SDS jedenkrát při laboratorní teplotě po dobu přibližně 10 min a potom jedenkrát při 65 °C přibližně 15 min a potom alespoň jedenkrát v 0,2 x SSC, 0,1% SDS při laboratorní teplotě alespoň 3 až 5 minut.

Další provedení je použití izolovaných nukleotidových sekvencí podle vynálezu při provádění postupů genetického inženýrství (jako je vložení transposonu nebo místně specifická mutace nebo delece, ale s výhodou homologní rekombinace) v oblasti 1000 bp proti směru transkripce chromosomálního genu gramnegativní bakterie buď pro zvýšení nebo snížení exprese genu. Kmen, ve kterém má rekombinace probíhat, je s výhodou stejný jako kmen, ze kterého byly získány sekvence v oblasti proti směru transkripce podle vynálezu. Genomy meningokoků A, B, C, Y a W a gonokoků jsou však dostatečně

podobné, aby sekvence umístěná proti směru transkripce z jakéhokoli z těchto kmenů mohla být vhodná pro navrhování vektorů pro provádění těchto kroků v jiných kmenech. Tak tomu může být také v případě *Haemophilus influenzae* a netypovatelného *Haemophilus influenzae*.

Příklady provedení vynálezu

Dále uvedené příklady se provádějí s použitím standardních technik, které jsou dobře známé a pro odborníky v oboru rutinní, kromě případů, které se podrobně popisují. Příklady jsou uvedeny pro ilustraci a nemají vynález omezovat.

Příklad 1

Konstrukce kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího polysacharidy obalu

Plasmid pMF121 (Frosch a další, 1990) byl použit pro konstrukci kmene *Neisseria meningitidis* B postrádajícího obalový polysacharid. Plasmid obsahuje obklopující oblasti místa genu kódujícího biosyntetickou cestu polysacharidu skupiny B (B PS), a genu rezistence na erythromycin. Delece B PS vedla ke ztrátě exprese obalového polysacharidu skupiny B stejně jako delece v aktivní kopii *galE* vedoucí k syntéze LPS deficientního na galaktózu.

Transformace kmene

Pro transformaci byl zvolen kmen *Neisseria meningitidis* B H44/76 (B:15:P1.7, 16; Los 3,7,9). Po inkubaci v přítomnosti CO₂ na plotně MH (bez erythromycinu) byly buňky odebrány do kapalného média MH obsahujícího 10mM MgCl₂ (na jednu plotnu MH byly použity 2 ml) a suspenze byly zředěny na OD 0,1 (550 nm). K těmto 2 ml

roztoku byly přidány 4 μ l zásobního roztoku plasmidu pMF121 (0,5 μ g/ml) na 6 hod inkubaci při 37 °C (bez třepání). Kontrolní skupina byla připravena se stejným množstvím bakterie *Neisseria meningitidis* B, ale bez přidání plasmidu. Po inkubační době bylo 100 μ l kultury bez ředění, při ředění 1/10, 1/100 a 1/1000 vyseto na plotny MH obsahující 5, 10, 20, 40 nebo 80 μ g erythromycinu/ml před inkubací 48 hod při 37 °C.

Otiskování kolonií

Po inkubaci na plotnách bylo pěstováno 20 kolonií a byla provedena selekce z ploten MH obsahujících 10 a 20 μ g erythromycinu/ml, přičemž v kontrolní skupině bez transformace plasmidem nebyl pozorován žádný růst kolonií. Kmen H44/76 standardního typu nebyl schopen růst na selekčních erythromycinových plotnách (10 až 80 μ g erythromycinu/ml). O jeden den později byly všechny viditelné kolonie vysety na nové plotny MH bez erythromycinu, aby byl umožněn jejich nárůst. Potom byly převedeny na nitrocelulózové listy (otiskování kolonií, colony blotting) pro testování přítomnosti polysacharidu B. Ve stručnosti, kolonie byly otisknuty na list nitrocelulózy a byly přímo opláchnuty v pufru PBS - 0,05 % Tween 20, před inaktivací buněk 1 hod při 56 °C v PBS - 0,05% Tween 20 (ředicí pufr). Potom byla membrána převrstvena na 1 hod ředicím pufrům při laboratorní teplotě. Listy byly potom opět promyty 3 x 5 min v ředicím pufru před inkubací s monoklonální protilátkou anti-B PS 735 (Boehringer) v ředění 1/3000 v ředicím pufru po dobu 2 hod při laboratorní teplotě. Po dalším kroku praní (3 x 5 min) byla monoklonální protilátka detekována biotinylovanou protilátkou proti myšímu Ig firmy Amersham (RPN 1001) ředěnou 500 x v ředicím pufru (1 hod při laboratorní teplotě), před provedením dalšího promývacího kroku (jak bylo popsáno výše). Potom byly listy inkubovány 1 hod při laboratorní teplotě roztokem komplexu

streptavidin-peroxidáza zředěným 1/1000 v ředicím pufru. Po posledních třech krocích praní použitím stejného způsobu byly nitrocelulózkové listy inkubovány 15 min temnu s vyvíjecím roztokem (30 mg 4chlor-1-naftolu v 10 ml methanolu plus 40 ml PBS a 30 μ l H_2O_2 37% firmy Merck). Reakce byla zastavena krokem promytí destilovanou vodou.

Metody ELISA na celých buňkách

Metoda ELISA na celých buňkách byla prováděna s použitím dvou transformovaných kolonií („D“ a „R“) s kmene standardního typu (H44/76) jako potahovací bakterie (20 μ g proteinu/ml), a pro charakterizaci kmenů *Neisseria meningitidis* byl použit soubor různých monoklonálních protilátek. Byly testovány následující monoklonální protilátky: anti-B PS (735 firmy Dr Frosch), a jiné monoklonální protilátky firmy NIBSC: anti-B PS (Ref 95/750) anti-P1.7 (A-PorA, Ref 4025), anti-P1.16 (A PorA, Ref 95/720), anti-Los 3,7,9 (A-LPS, Ref 4047), anti-Los 8 (A-LPS, Ref 4048), a anti-P1.2 (A-PorA Ref 95/696).

Mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc) byly potaženy 100 μ l roztoku rekombinantních buněk meningokoka B přes noc při 37 °C a koncentraci přibližně 20 μ g/ml v PBS. Potom byly destičky 3 x promyty 300 μ l 150mM NaCl - 0,05 % Tween 20, a byly převrstveny 100 μ l PBS - 0,3% kasein a inkubovány 30 min při laboratorní teplotě za třepání. Plotny byly znovu promyty stejným postupem jako výše při inkubaci s antibiotiky. Monoklonální protilátky (100 μ l) byly použity při rozdílných ředěních (jak je ukázáno na obr. 2) v PBS - 0,3 % kasein, 0,05% Tween 20 a vloženy na mikrodestičky před inkubací při laboratorní teplotě 30 min za třepání, před dalším identickým krokem praní. Do jamek bylo přidáno 100 μ l protilátky proti myšímu Ig (králíčí, Dakopatts E0413) konjugované s biotinem a zředěné 1/2000 v PBS - 0,3% kasein - 0,05% Tween 20 pro detekci vazby monoklonálních protilátek. Po promývacím kroku (jak bylo popsáno výše) byly destičky

inkubovány s roztokem komplexu streptavidin-peroxidáza (100 μ l the Amersham RPN 1051) v ředění 1/4000 ve stejném pracovním roztoku po dobu 30 min při laboratorní teplotě za třepání. Po této inkubaci a posledním kroku praní se destičky inkubují se 100 μ l roztoku chromogenu (4 mg orthofenylendiaminu, OPD) v 10 ml 0,1M citrátového pufru pH 4,5 s 5 μ l H_2O_2) 15 min v temnu. Destičky se potom odečítají při 490/620 nm na spektrofotometru.

Výsledky

Obr. 1 ukazuje, že z 20 izolovaných kolonií, které byly schopné růst na selekčním médiu s erythromycinem, se pouze dvě kolonie („D“ a „R“) ukázaly jako negativní na přítomnost polysacharidu B. Mezi dalšími bylo 16 jasně pozitivních na B PS a stále ještě rezistentních na erythromycin. To ukázalo, že plasmid byl sice do jejich genomu integrován, ale se špatnou orientací, což udrželo intaktní gen B PS a LPS (nedošlo k dvojitému crossing-over). Pozitivní a negativní kontroly byly také testovány na plotnách, a ukázalo se, že kmen NmB H44/76 standardního typu byl jasně pozitivní na polysacharid β , zatímco kmeny meningokoka A (A1) a meningokoka C (C11) byly s touto monoklonální protilátkou anti-B PS 735 jasně negativní. Tyto výsledky ukazují, že přibližně 10 % vybraných kolonií mělo správně integrovaný plasmid do svých genomů provedením crossing-over, při udržení genů B PS a LPS intaktních a exprimovaných.

Výsledky s použitím ELISA s celými buňkami (obr. 2 a tabulka níže) jasně ukazují, že dva transformanty „D“ a „R“ (odvozené z kolonií D a R) nemohou být již rozpoznány monoklonálními protilátkami anti-B PS (735 a 95/750), ani monoklonálními protilátkami anti-Los 3,7,9 a anti-Los 8. Při použití specifických monoklonálních protilátek anti-PorA však je jasná reakce s monoklonálními protilátkami anti-P1.7 a anti-P1.16 na buňkách, jak se také pozoruje u kmene standardního typu. U nespecifických monoklonálních protilátek anti-PorA (anti-P1.2 mab)

nebyla žádná reakce pozorována. Tyto výsledky potvrzují, že protein PorA, a zvláště epitopy P1.7 a P1.16 jsou po transformaci stále přítomné, zatímco polysacharid B a epitopy Los 3.7, 9 a Los 8 (LPS) přítomné nebyly.

Taulka: Specificity testovaných monoklonálních protilátek

Testované monoklonální protilátky	Zaměřené proti	Výsledek
Anti-B PS 735	Polysacharid B	++ na kmenu standardního typu (-) na mutantech „D“ a „R“
Anti-B PS 95/750 z NIBSC	B PS	++ na kmenu standardního typu (-) na mutantech „D“ a „R“
Anti-P1.7 (NIBSC)	Smyčka 1 porinu A	++ na všech typech standardního typu a mutantních řetězcích
Anti-P1.16 (NIBSC)	Smyčka 4 porinu A	++ na všech typech standardního typu a mutantních řetězcích
Anti-Los 3,7,9	LPS	++ na kmenu standardního typu (-) na mutantech „D“ a „R“
Anti-Los 8 (NIBSC)	LPS	+/- na kmenu standardního typu (-) na mutantech „D“ a „R“
Anti-P1.2 (NIBSC)	Anti-porin A Sérosubtyp 1.2	(-) na všech typech standardního typu a mutantních řetězcích

Konstrukce univerzálních vektorů pro dodávání genů (série pCMK) směřující integraci do místa *porA* *Neisseria meningitidis*

Byl zkonstruován plasmid umožňující homologní rekombinaci a stabilní integraci cizí DNA do místa *porA* *Neisseria meningitidis*. Tento dodávací vektor (geny, operony a/nebo expresní kazety) je využitelný pro konstrukci kmenů *Neisseria meningitidis* produkujících rekombinantní, zlepšené váčky. Typicky obsahuje takový vektor alespoň: (1) plasmidovou kostru replikující se v *E. coli*, ale ne

v *Neisseria meningitidis* (suicide plasmid), (2) alespoň jednu, ale s výhodou dvě oblasti homologie pro směřování integrace do místa chromosomu jako je *porA*, (3) účinné transkripční (promotor, regulační oblast a terminátor) a translační (optimalizované vazebné místo ribosomu a iniciační kodon) signály fungující v *Neisseria meningitidis*, (4) vícečetné klonovací místo a (5) selektovatelný gen nebo geny umožňující udržení plasmidu v *E. coli* a selekci integrovaných genomů v *Neisseria meningitidis*. Mezi další prvky patří například přijímací sekvence (uptake sequences) pro umožnění vstupu cizí DNA do *Neisseria meningitidis*, a markery s negativní selekcí (counter selectable markers), jako je *sacB*, *rpsL*, *gltS* pro zvýšení frekvence dějů dvojitého crossing-overu.

Schematické znázornění vektoru zkonstruovaného v tomto příkladu a označeného pCMK je znázorněno v obr. 3. Jeho odpovídající úplná nukleotidová sekvence je ukázána v SEQ. ID NO: 1. pCMK se odvozuje od kostry pSL1180 (PharmaciaBiotech, Švédsko), což je plasmid s vysokým počtem kopií, který se replikuje v *E. coli*, nesoucí gen *bla* (a tím propůjčující rezistenci na ampicilin). Navíc obsahuje pCMK dvě obklopující oblasti *porA* (*porA*5' a *porA*3' obsahující terminátor transkripce) nutné pro homologní rekombinaci, a selektovatelný marker propůjčující rezistenci na kanamycin, dvě příjmové sekvence, chimérní promotor *porA/lacO* reprimovaný v hostitelské *E. coli* exprimující *lacI^q*, ale transkripčně aktivní v *Neisseria meningitidis*, a vícečetné klonovací místo (obsahující pět štěpicích míst: *NdeI*, *KpnI*, *NheI*, *PinAI* a *SphI*) nezbytné pro vkládání cizí DNA do pCMK.

pCMK byl zkonstruován následujícím způsobem. Oblasti umožňující rekombinace *porA*5' a *porA*3' a promotor *porA/lacO* byly amplifikovány PCR použitím oligonukleotidů uvedených v následující tabulce, klonovány v pTOPO a sekvenovány. Tyto fragmenty DNA byly postupně vyříznuty z pTOPO a znovu klonovány do pSL1180. Kazeta rezistence na kanamycin byla vyříznuta z plasmidu pUC4K

(PharmaciaBiotech, Švédsko) a abyla vložena mezi obklopující oblast *porA5'* a promotorovou oblast *porA/lacO*.

Tabulka: Oligonukleotidy používané při PCR

Oligonukleotidy	Sekvence	Poznámky
PorA5' Fwd	5'-CCC AAG CTT <u>GCC GTC TGA</u> <u>ATA</u> CAT CCC GTC ATT CCT CA-3'	Klonovací místo <i>HindIII</i> příjmová sekvence ()
PorA5' Rev	5'-CGA TGC TCG CGA CTC CAG AGA CCT CGT GCG GGC C-3'	Klonovací místo <i>NruI</i>
PorA3' Fwd	5'-GGA AGA <u>TCT GAT TAA ATA</u> <u>GGC</u> GAA AAT ACC AGC TAC GA- 3'	Klonovací místo <i>BglII</i> stopkodony ()
PorA3' Rev	5'-GCC GAA TTC <u>TTC AGA CGG C</u> GC AGC AGG AAT TTA TCG G-3'	Klonovací místo <i>EcoRI</i> příjmová sekvence ()
PoLa Rev1	5'-GAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TCC GGG CAA ACA CCC GAT AC-3'	
PoLa Rev2	5'-GAA TTC CAT ATG ATC GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA TAA AAA CCT AAA AAC ATC GAA TTG TTA TCC GCT C-3'	Klonovací místo <i>NdeI</i>
PorAlacO Fwd	5'-AAG CTC TGC AGG AGG TCT GCG CTT GAA TTG-3'	Klonovací místo <i>PstI</i>
PorAlacO Rev	5'-CTT AAG GCA TAT GGG CTT CCT TTT GTA A-3'	Klonovací místo <i>NdeI</i>
PPA1	5'-GCG GCC GTT GCC GAT GTC AGC C-3'	
PPA2	5'-GGC ATA GCT GAT GCG TGG AAC TGC-3'	
N-full-01:	5'-GGG AAT TCC ATA TGA AAA AAG CAC TTG CCA CAC-3'	Klonovací místo <i>NdeI</i>

Tabulka - pokračování

Oligonukleotidy	Sekvence	Poznámky
Nde-NspA-3:	5'-GGA ATT CCA TAT GTC AGA ATT TGA CGC GCA C-3'	Klonovací místo <i>NdeI</i>
PNS1	5'-CCG CGA ATT CGG AAC CGA ACA CGC CGT TCG-3'	Klonovací místo <i>EcoRI</i>
PNS1	5'-CGT CTA GAC GTA GCG GTA TCC GGC TGC-3'	Klonovací místo <i>XbaI</i>
PromD15-51X	5'-GGG CGA ATT CGC GGC CGC CGT CAA CGG CAC ACC CGT TG- 3'	Klonovací místa <i>EcoRI</i> a <i>NotI</i>
PromD15-S2	5'-GCT CTA GAG CGG AAT GCG GTT TCA GAC G-3'	Klonovací místo <i>XbaI</i>
PNS4	5'-AGC TTT ATT TAA ATC CTT AAT TAA CGC GTC CGG AAA ATA TGC TTA TC_34	Klonovací místa <i>SwaI</i> a <i>PacI</i>
PNS5	5'-AGC TTT GTT TAA ACC CTG TTC CGC TGC TTC GGC-3'	Klonovací místo <i>PmeI</i>
D15-S4	5'-GTC CGC ATT TAA ATC CTT AAT TAA GCA GCC GGA CAG GGC GTG G-3'	Klonovací místa <i>SwaI</i> a <i>PacI</i>
D15-S5	5'-AGC TTT GTT TAA AGG ATC AGG GTG TGG TCG GGC-3'	Klonovací místo <i>PmeI</i>

Příklad 3

Konstrukce kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího jak obalové polysacharidy, tak hlavní imunodominantní antigen PorA

Modulace obsahu antigenů váčků vnější membrány může být výhodná při zlepšování jejich bezpečnosti a účinnosti při použití ve vakcínách, nebo při diagnostických nebo terapeutických použití. Složky jako jsou obalové polysacharidy *Neisseria meningitidis*

séroskopiny B by měly být odstraněny, aby se vyloučilo riziko vyvolání autoimunitních reakcí (viz příklad 1). Podobně je prospěšné potlačit imunodominanci hlavních antigenů vnější membrány, jako je PorA, které indukují baktericidní protilátky specifické pro kmen, ale neposkytují zkříženou ochranu. Pro ilustraci takového přístupu použili autoři vynálezu vektor pCMK(+) pro konstrukci kmene *Neisseria meningitidis* séroskopiny B postrádajícího jak obalové polysacharidy, tak imunodominantní proteinový antigen vnější membrány PorA. K tomuto účelu byla zavedena delece genu *porA* do kmene H44/76 *cps*- popisovaného v příkladu 1 metodou homologní rekombinace.

Kmen H44/76 *cps*- byl připraven v kompetentním stavu a transformován 2 µg DNA plasmidu pCMK(+) v nadšroubovicovém stavu, jak bylo popsáno výše. Alikvotní frakce transformační směsi (100 µl) byly vysety na Mueller-Hintonovy plotny doplněné kanamycinem (200 µg/ml) a inkubovány při 37 °C 24 až 48 hod. Byly vybrány kolonie rezistentní na kanamycin, rozetřeny na MH-Kn a pěstovány dalších 24 hod při 37 °C. V tomto stupni byla polovina bakteriální kultury použita pro přípravu glycerolových zásobních suspenzí (15 % obj.) a tyto suspenze byly udržovány v zamraženém stavu při -70 °C. Další frakce (odhadem 10⁸ bakterií) byla resuspendována v 15 µl destilované vody, vařena 10 min a použita jako templát pro PCR screening. Byly syntetizovány dva vnitřní primery *porA* nazvané PPA1 a PPA2, které byly použity pro amplifikaci PCR u vařených bakteriálních lyzátů za podmínek popsanych výrobcem (HiFi DNA polymerase, Boehringer Mannheim, GmbH). Bylo použito následujících teplotních cyklů: 25 x (94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 3 min) a 1 x (72 °C 10 min, 4 °C až do izolace). Protože proces crossing-over mezi DNA pCMK a místem chromosomu *porA* odstraní oblast vyžadovanou pro teplotní hybridizaci #1 a #2, klony postrádající amplifikační fragment 1170 bp z PCR byly selektovány jako deleční mutanty *porA*. Tyto výsledky PCR byly dále potvrzeny paralelní analýzou přítomnosti PorA v odpovídajících extraktech bakteriálních

proteinů. Pro tento účel byl další alikvot bakterií (odhadem 5×10^8 bakterií) resuspendován v 50 μ l pufru PAGE-SDS (SDS 5%, glycerol 30%, beta-merkaptoethanol 15%, bromofenolová modř 0,3 mg/ml, tris-HCl 250 mM pH 6,8), vařen (100 °C), zmrazen (-20 °C)/vařen (100 °C) třikrát, a byl dělen elektroforézou PAGE-SDS na 12,5 % gelu. Gely byly potom barveny barvivem Coomassie Brilliant blue R250 nebo převedeny na nitrocelulózovou membránu a testovány monoklonální protilátkou anti-PorA, jak se popisuje v Maniatis a další. Jak je uvedeno na obr. 4, jak barvení Coomassie, tak i barvení imunologického přenosu potvrdily, že *porA* PCR negativní klony neprodukují detekovatelné hladiny PorA. Tento výsledek potvrzuje, že vektor pCMK je funkční, a může být úspěšně použit pro směrování vkládání DNA do genu *porA*, přičemž současně se potlačí produkce proteinového antigenu vnější membrány PorA.

Příklad 4

Regulace ke zvýšení exprese proteinu vnější membrány NspA ve váčkách odvozených z rekombinantního kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího funkční geny *porA* a *cps*

Obohacování váček ochrannými antigeny je výhodné pro zlepšování účinnosti a rozsahu pokrytí vakcín založených na proteinu vnější membrány. V této souvislosti byly zkonstruovány rekombinantní kmeny *Neisseria meningitidis* postrádající funkční geny *cps* a *porA* tak, že byla zvýšena míra exprese vnějšího membránového proteinu NspA. K tomuto účelu byl pomocí PCR amplifikován gen kódující NspA s použitím oligonukleotidových primerů N01-full-NdeI a NdeI-3' (viz tabulka v příkladu 2). Pro amplifikaci PCR byly použity podmínky popsané dodavatelem (HiFi DNA polymerase, Boehringer Mannheim, GmbH). Cyklování teploty bylo prováděno následovně: 25 x (94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 3 min), a 1 x (72 °C 10 min, 4 °C až do izolace). Odpovídající ampikon byl štěpen NdeI a vložen do

restrikčního místa *NdeI* dodávacího vektoru pCMK(+). Byla zkontrolována orientace inzertu a rekombinantní plasmidy označené pCMK(+)-NspA byly čištěny ve velkém měřítku s použitím soupravy QIAGEN maxiprep kit a 2 µg tohoto materiálu byly použity pro transformaci *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího funkční geny *cps* (kmen popsáný v příkladu 1). Integrace prostřednictvím děje crossing-over mezi vektorem pCMK(+)-NspA a místem chromosomu *porA* byly selektovány kombinací screeningu PCR a westernovým přenosem použitím postupů uvedených v příkladu 3.

Bakterie (v množství odpovídajícím přibližně 5×10^8 bakterií) byly resuspendovány v 50 µl pufru PAGE-SDS, zmrazeny (-20 °C)/vařeny (100 °C) třikrát a potom byly děleny elektroforézou PAGE-SDS na 12,5% gelu. Gely byly potom barveny Coomassie Brilliant blue R250 nebo převedeny na nitrocelulózovou membránu a testovány polyklonálním sérem anti-NspA. Jak barvení Coomassie (údaje nejsou ukázány), tak i barvení imunologického přenosu (viz obr. 4) potvrdily, že *porA* PCR negativní klony neprodukují detekovatelné hladiny PorA. Expres NspA byla testována v lyzátech celých bakterií (WCBL) nebo prostředků s vložky vnější membrány odvozenými od NmB (*cps*-, *porA*-) nebo NmB (*cps*-, *porA*-, *Nspa*+). Ačkoli při barvení Coomassie nebyl pozorovatelný žádný rozdíl, imunologický přenos s polyklonálním sérem anti-NspA detekoval tři až pětinasobné zvýšení exprese NspA (vzhledem k hladině endogenního NspA), jak v lyzátech celých bakterií, tak i v prostředcích s vložky vnější membrány (viz obr. 5). Tento výsledek potvrzuje, že vektor pCMK(+)-NspA je funkční a může být úspěšně použit pro zvýšení exprese proteinů vnější membrány, jako je NspA, při současném snížení produkce antigenního proteinu vnější membrány PorA.

Příklad 5

Regulace proteinového antigenu vnější membrány D15/Omp85 ke zvýšení exprese ve váčcích odvozených z rekombinantního kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího funkční geny *cps*, ale exprimujícího PorA

Některé geograficky izolované lidské populace (jako například Kuba) jsou infikovány omezeným počtem izolátů *Neisseria meningitidis*, které z velké míry náleží k jednomu nebo několika sérotypům proteinů vnější membrány. Protože PorA je hlavní proteinový antigen vnější membrány indukující ochranné a pro kmen specifické baktericidní protilátky, je potom možné dosáhnout vakcinační ochrany použitím omezeného počtu sérotypů PorA ve vakcíně. V této souvislosti může být výhodná přítomnost PorA ve váčcích vnější membrány, protože zesiluje účinnost vakcíny těchto rekombinantně vylepšených váčků. Tyto vakcíny s obsahem PorA mohou být však ještě dále zlepšovány zvýšením hladiny jiných zkříženě reaktivních OMP, jako je omp85/D15.

V následujícím příkladu byl použit vektor pCMK(+) pro regulaci ke zvýšení exprese antigenního proteinu vnější membrány Omp85/D15 v kmeni postrádajícím funkční geny *cps*, ale exprimujícím *porA*. K tomuto účelu byl metodou PCR amplifikován gen kódující Omp85/D15 použitím oligonukleotidových primerů D15-NdeI a D15-NotI. Pro amplifikaci PCR byly použity stejné podmínky jako byly popsány dodavatelem (HiFi DNA polymerase, Boehringer Mannheim, GmbH). Cyklování teploty bylo následující: 25 x (94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 3 min) a 1 x (72 °C 10 min, 4 °C až do izolace). Odpovídající amplikon byl vložen do klonovacího vektoru pTOPO podle specifikací výrobce a pro potvrzení bylo provedeno sekvenování. Tento fragment DNA Omp85/D15 byl vyříznut z pTOPO restrikcí hydrolýzou použitím NdeI/NsiI a následně klonován do odpovídajících restrikcí míst dodávacího vektoru pCMK(+). Rekombinantní

plasmidy označené pCMK(+)-D15 byly čištěny ve velkém měřítku použitím soupravy QIAGEN maxiprep kit a 2 µg tohoto materiálu byly použity pro transformaci kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího funkční geny *cps* (kmen popsáný v příkladu 1). Pro zachování exprese *porA*, byla provedena selekce na integraci v důsledku jednoduchého crossing-overu (buď v Omp85/D15 nebo v *porA*) kombinací screeningových postupů PCR a westernového přenosu. Klony rezistentní na kanamycin, které byly pozitivně testovány *porA*-specifickou PCR a westernovým přenosem byly uchovávány při -70 °C jako zásobní roztoky v glycerolu a použity pro další studie.

Bakterie (odpovídající přibližně 5×10^8 bakteriím) byly resuspendovány v 50 µl pufru PAGE-SDS, zmrazeny (-20 °C)/vařeny (100 °C) třikrát a potom byly odděleny elektroforézou PAGE-SDS na 12,5 % gelu. Gely byly potom obarveny Coomassie Brilliant blue R250 nebo převedeny na nitrocelulózovou membránu a testovány monoklonální protilátkou anti-*porA*. Jak je ukázáno na obr. 6, jak barvení Coomassie, tak i barvení imunologického přenosu ukázaly, že *porA* PCR pozitivní klony produkují PorA.

Exprese D15 byla testována použitím prostředků obsahujících váčky vnější membrány odvozené od NmB (*cps*-, *porA*-) nebo NmB (*cps*-, *porA*+, D15+). Barvení Coomassie detekovalo podstatné zvýšení exprese D15 (vzhledem k hladině endogenního D15), v prostředcích (viz obr. 6). Tento výsledek potvrdil, že vektor pCMK(+)-D15 je funkční a může být úspěšně použit pro regulaci ke zvýšení exprese proteinů vnější membrány jako je D15, aniž by se utlumila produkce hlavního proteinového antigenu vnější membrány PorA.

Příklad 6

Konstrukce univerzálních vektorů pro dodání promotorů

Princip: Princip tohoto přístupu je ukázán na obr. 7 a může být shrnut do sedmi nezbytných kroků. Některé z těchto kroků jsou ilustrovány dále na konstrukci vektoru pro regulaci ke zvýšení exprese NspA a D15/Omp85.

Vektor pro regulaci ke zvýšení exprese genu NspA

Krok 1: Oblast DNA (997 bp) umístěná proti směru transkripce vzhledem ke genu kódujícímu NspA byla objevena (SEQ. ID NO: 2) v privátní databázi Incyte PathoSeq obsahující nedokončené genomové sekvence DNA z *Neisseria meningitidis* kmen ATCC 13090. Byly navrženy dva oligonukleotidové primery označené jako PNS1 a PNS2 (viz tabulku v příkladu 2) s použitím této sekvence a byly syntetizovány. Tyto primery byly použity pro amplifikaci PCR použitím genomické DNA extrahované z kmene H44/76.

Krok 2: Odpovídající amplikony byly vyčištěny použitím soupravy Wizard PCR kit (Promega, USA) a štěpeny restričními enzymy *EcoRI/XbaI* 24 hod za podmínek popsanych dodavatelem (Boehringer Mannheim, Německo). Odpovídající fragmenty DNA byly čištěny na gelu a vloženy do odpovídajících míst klonovacího vektoru pUC18.

Krok 3: Rekombinantní plasmidy byly připraveny ve velkém měřítku a alikvot byl použit jako templát pro inverzní amplifikaci PCR. Inverzní PCR byla prováděna použitím oligonukleotidů PNS4 a PNS5 a následujících podmínek teplotních cyklů: 25 x (94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 3 min) a 1 x (72 °C 10 min, 4 °C až do izolace). Byly získány linearizované vektory pUC18 nesoucí delecii v oblasti proti směru transkripce vzhledem k NspA.

Vektor pro řízení exprese pro její zvýšení genu D15/omp85

Krok 1: Oblast DNA (1000 bp) umístěná proti směru transkripce vzhledem ke genu kódujícímu D15/omp85 (SEQ. ID NO: 3) byla objevena v soukromé databázi Incyte PathoSeq obsahující nedokončené sekvence genomové DNA kmene *Neisseria meningitidis* ATCC 13090. Byly navrženy a syntetizovány dva oligonukleotidové primery označené jako PromD15-51X a PromD15-S2 (viz tabulka v příkladu 2) na základě této sekvence. Tyto primery byly použity pro amplifikaci PCR použitím genomické DNA extrahované z kmene H44/76.

Krok 2: Odpovídající amplikony byly vyčištěny použitím soupravy Wizard PCR kit (Promega, USA) a vystaveny štěpení restrikčními enzymy *EcoRI/XbaI* 24 hod za podmínek popsanych dodavatelem (Boehringer Mannheim, Německo). Odpovídající fragmenty DNA byly čištěny na gelu a vloženy do odpovídajících míst klonovacího vektoru pUC18.

Krok 3: Rekombinantní plasmidy byly připraveny ve velkém měřítku a alikvot byl použit jako templát pro inverzní amplifikaci PCR. Inverzní PCR byla prováděna použitím oligonukleotidů D15-S4 a D15-S5 za následujících podmínek cyklování teploty: 25 x (94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 3 min) a 1 x (72 °C 10 min, 4 °C až do izolace). Byly získány linearizované vektory pUC18 nesoucí delecí v inzertu proti směru transkripce, D15/omp85.

Příklad 7

Postupy fermentace pro přípravu rekombinantních váčků

Příklady uvedené dále popisují způsoby výroby rekombinantních váčků postrádajících buď obalové polysacharidy nebo obalové polysacharidy a PorA. Tento postup může být použit pro široké

rozmezí rekombinantních kmenů *Neisseria meningitidis* a může být upraven pro provádění ve větším měřítku.

Kultivační média: *Neisseria meningitidis* séro skupiny B byla pomnožena v pevných (FNE 004 AA, FNE 010 AA) nebo kapalných (FNE 008 AA) kultivačních médiích. Tato nová média pro pěstování meningokoků jsou s výhodou prostá živočišných produktů, a jsou považována za další provedení vynálezu.

Složky	FNE 004 AA	FNE 008 AA	FNE 010 AA
Agar	18 g/l	-	18 g/l
NaCl	6 g/l	6 g/l	6 g/l
Glutaman sodný	-	1,52 g/l	-
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,2 g/l	2,2 g/l	2,2 g/l
KCl	0,09 g/l	0,09 g/l	0,09 g/l
NH ₄ Cl	1,25 g/l	1,25 g/l	1,25 g/l
Glukóza	5 g/l	20 g/l	5 g/l
Kvasničný extrakt UF	-	2,5 g/l	-
Sojový pepton	5 g/l	30 g/l	5 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,015 g/l	-	0,015 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6 g/l	0,6 g/l	0,6 g/l
Erythromycin	0,015 g/l	-	-
Kanamycin	-	-	0,2 g/l

Kultivace rekombinantních váčků *Neisseria meningitidis* séro skupiny B cps-

Metoda byla prováděna ve dvou stupních zahrnujících předkultivaci na pevném médiu a následnou kultivaci v kapalném médiu. Při předkultivaci na pevném médiu byla baňka očkovací kultury odstraněna z mrazicího boxu (-80 °C), ponechána roztát na laboratorní

teplotu a 0,1 ml bylo rozetřeno na Petriho misku obsahující 15 ml média FNE004AA (viz výše). Petriho miska byla inkubována při 37 °C 18 ± 2 hod. Nárůst na povrchu byl resuspendován v 8 ml FNE008AA (viz výše) doplněném 15 mg/l erythromycinu. Při kultivaci v baňkách byly 2 ml resuspendované předkultury na pevném médiu přidány do dvoulitrové baňky obsahující 400 ml média FNE008AA doplněného 15 mg/l erythromycinu. Baňka byla umístěna na třepací desku (200 ot/min) a inkubována při 37 °C 16 ± 2 hod. Buňky byly z kultivačního média odděleny centrifugací při 5000 g při 4 °C 15 min.

Vsádková kultivace rekombinantních váčků *Neisseria meningitidis* séro skupiny B cps-

Tento postup byl prováděn ve třech stupních zahrnujících předkultivaci na pevném médiu, kultivaci v kapalném médiu a vsádkovou kultivaci. Při provádění předkultivace na pevné půdě byla lahvička s očkovacím materiálem vyjmuta z mrazicího boxu (-80 °C), ponechána roztát na laboratorní teplotu a 0,1 ml bylo rozetřeno na Petriho misku obsahující 15 ml FNE004AA (viz výše). Petriho miska byla inkubována při 37 °C 18 ± 2 hod. Nárůst na povrchu byl resuspendován v 8 ml média FNE008AA (viz výše) doplněného 15 mg/l erythromycinu. Při předkultivaci v kapalném médiu bylo přidáno 2 ml resuspendované předkultivce na pevné půdě do jedné dvoulitrové baňky obsahující 400 ml FNE008AA doplněného 15 mg/l erythromycinu. Baňka byla umístěna na třepací desku (200 ot/min) a inkubována při 37 °C 16 ± 2 hod. Obsah baňky byl použit pro zaočkování 20 litrového fermentoru. Při vsádkové kultivaci ve fermentoru bylo inokulum (400 ml) přidáno do předem vysterilizovaného fermentoru s celkovým objemem 20 l obsahujícího 10 l média FNE008AA doplněného 15 mg/l erythromycinu. pH bylo nastaveno na 7,0 a udržováno na této hodnotě automatickým přidáváním NaOH (25% hmotn./obj.) a H₃PO₄ (25% obj.). Teplota byla

regulována na 37 °C. Rychlost vzdušnění byla udržována na 20 l vzduchu/minuta a koncentrace rozpuštěného kyslíku byla udržována na 20 % saturace řízením rychlosti míchání. Přetlak ve fermentoru byl udržován na 300 g/cm² (30 kPa). Po 9 ± 1 hod byla kultura ve stacionární fázi. Buňky byly z kultivačního média odděleny centrifugací při 5000 g při 4 °C 15 min.

Kultivace rekombinantních váčků *Neisseria meningitidis* séroskupiny B cps-, PorA-

Tato kultivace byla prováděna ve dvou stupních zahrnujících předkultivaci na pevném médiu a potom kultivaci v kapalném médiu. Při kultivaci na pevném médiu byla lahvička s očkovací kulturou vyjmuta z mrazicího boxu (-80 °C), ponechána roztát na laboratorní teplotu a 0,1 ml bylo rozetřeno na Petriho misku obsahující 15 ml FNE010AA (viz výše). Petriho miska byla inkubována při 37 °C 18 ± 2 hod. Nárůst na povrchu byl resuspendován v 8 ml FNE008AA (viz výše) doplněného 200 mg/l kanamycinu. Při kultivaci v baňkách byly přidány 2 ml resuspendované předkultivace na pevném médiu do dvoulitrové baňky obsahující 400 ml média FNE008AA doplněného 200 mg/l kanamycinu. Baňka byla umístěna na třepací desku (200 ot/min) a inkubována při 37 °C 16 ± 2 hod. Buňky byly z kultivačního média odděleny centrifugací při 5000 g při 4 °C 15 min.

Příklad 8: Izolace a čištění váčků z meningokoků zbavených obalového polysacharidu

Rekombinantní váčky byly čištěny následujícím způsobem. Buněčná pasta (42 g) byla suspendována ve 211 ml pufru 0,1M Tris-Cl pH 8,6 obsahujícího 10mM EDTA a 0,5% deoxycholát sodný (DOC). Poměr pufru k biomase byl 5/1 (obj./hmotn.). Biomasa byla extrahována magnetickým mícháním 30 min při laboratorní teplotě.

Celkový extrakt byl potom centrifugován při 20 000 g 30 min při 4 °C (13 000 ot/min v rotoru JA-20, centrifuga Beckman J2-HS). Usazené buňky byly převedeny do odpadu. Supernatant byl ultracentrifugován při 125 000 g 2 hod při 4 °C (40 000 od/min v rotoru 50.2Ti, ultracentrifuga Beckman L8-70M), aby se dosáhlo zakoncentrování váčků. Supernatant byl odlit. Usazenina byla opatrně resuspendována ve 25 ml 50mM pufru Tris-Cl pH 8,6 s obsahem 2mM EDTA, 1,2% DOC a 20% sacharózy. Po druhé ultracentrifugaci při 125 000 g 2 hod při 4 °C byly váčky opatrně resuspendovány ve 44 ml 3% sacharózy a uchovávány při 4 °C. Všechny roztoky používané pro extrakci a čištění váčků obsahovaly 0,01 % thiomersalu. Jak je ukázáno na obr. 8, tento postup poskytne proteinové preparáty, které jsou vysoce obohacené na proteiny vnější membrány, jako je PorA a PorB.

Příklad 9

Identifikace bakteriálních promotorů vhodných pro regulaci genů kódujících antigeny pro zvýšení exprese

Použití prvků silných bakteriálních promotorů je nezbytné pro dosažení řízení exprese pro její zvýšení u genů kódujících proteiny vnější membrány. V této souvislosti autoři vynálezu již dříve ukázali, že regulace ke zvýšení exprese genů *Neisseria meningitidis nspA*, *hsf*, a *omp85* s použitím promotoru *porA* umožnil izolovat rekombinantní váčky obohacené na odpovídající proteiny NspA, Hsf a Omp85. Alternativně k promotoru *porA* může být užitečné získat rozdílné úrovně zvýšení exprese, aby se předešlo potenciální změně fáze *porA* a/nebo aby se dosáhlo podmíněčné exprese genu (promotory regulované železem). Na tomto místě popisují autoři vynálezu způsob umožňující identifikaci přesného místa počátku transkripce silných promotorových prvků, které pravděpodobně poskytnou vysokou míru exprese u bakterií. Protože regulační prvky promotoru jsou klasicky obsaženy v oblasti 200 bp proti směru transkripce a 50 bp ve směru

transkripce vzhledem k místu +1 (Collado-Vides J., Magasanik B., Gralla J. D., 1991, Microbiol. Rev. 55 (3): 371 - 94), důsledkem takového experimentu je možná identifikace fragmentů DNA o délce přibližně 250 bp nesoucích silné promotorové aktivity. Hlavní proteiny vnější membrány, jako jsou u *Neisseria meningitidis* PorA, PorB a Rmp, u *Haemophilus influenzae* P1, P2, P5 a P6, u *Moraxella catarrhalis* OmpCD, OmpE, stejně jako některé cytoplasmatické a/nebo železem regulované proteiny těchto bakterií, obsahují silné promotorové prvky. Pro ověření této obecné metodologie mapovali autoři vynálezu místo počátku transkripce silných promotorů *Neisseria meningitidis* *porA* a *porB* použitím metody rychlé amplifikace prvků cDNA (5'RACE).

Podstata metody 5'RACE je následující: 1) Extrakce celkové RNA s použitím soupravy QIAGEN „RNeasy“ Kit. Odstranění genomické DNA působením DNázy s následným čištěním podle postupu QIAGEN; 2) reverzní transkripce mRNA s primerem pro 3'-konec specifickým pro *porA* (nazvaným porA3). Očekávaná velikost cDNA: 307 nukleotidů. Odstranění RNA alkalickou hydrolýzou; 3) Vložení jednořetězcové DNA oligonuleotidové ukotvovací sekvence (označené DT88) do 3'-konce cDNA použitím T4 RNAligázy. Očekávaná velikost produktu: 335 nukleotidů. Amplifikace cDNA s vloženou kotevní sekvencí použitím kombinace „hemi-nested“ PCR; 4) amplifikace PCR cDNA s vloženou ukotvovací sekvencí použitím ukotvovacího primeru s komplementární sekvencí jako primeru 5'-konce (nazvaného DT89) a primeru 3'-konce (nazvaného p1-2), který je vnitřní vzhledem ke 3'-konci RT primeru porA3. Očekávaná velikost produktu: 292 bp; 5) amplifikace PCR předešlých produktů PCR s použitím DT89 jako primeru 5'-konce a p1-1 jako primeru 3'-konce (vnitřní vzhledem k p1-2). Očekávaná velikost produktu: 211 bp; a 6) Sekvenování s primerem p1-1 (očekávanou velikost produktu je možno vypočíst, protože je známo místo zahájení transkripce *porA*: 59 nukleotidů před místem zahájení translace „ATG“).

Experimentální postup

Z přibližně 10^9 buněk *Neisseria meningitidis* séro skupiny B cps-*porA*+ byla extrahována celková RNA. Extrakce 1 ml kapalně kultury vhodné optické density ($OD_{600} = 1$) byla provedena soupravou QIAGEN „RNAeasy“ kit podle doporučení výrobce. Chromosomální DNA byla odstraněna přidáním 10 U bezRNázové DNázy (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) k 30 μ l eluované RNA s inkubací 37 °C 15 min. RNA zbavená DNA byla čištěna stejnou soupravou QIAGEN podle doporučení výrobce.

Reakce reverzní transkripce byly prováděny použitím primeru *porA3* a 200 U reverzní transkriptázy SUPERScript II (Life Technologies). Reakce RT byly prováděny v 50 μ l objemu obsahujícím následující složky: 5 μ l 2mM dNTP, 20 pmol primeru *porA3*, 5 μ l 10 x pufru SUPERScript II, 9 μ l 25mM $MgCl_2$, 4 μ l 0,1M DTT, 40 U rekombinantního inhibitoru ribonukleázy a 1 μ g celkové RNA. Primer *porA3* byl teplotně hybridizován postupně (70 °C 2 min, 65 °C 1 min, 60 °C 1 min, 55 °C 1 min, 50 °C 1 min, a 45 °C 1 min) před přidáním SUPERScript II. Reakce RT byla prováděna při 42 °C 30 min, a byla následována 5 cykly (50 °C 1 min, 53 °C 1 min a 56 °C 1 min) pro destabilizaci sekundární struktury RNA. Byly prováděny dvě paralelní reakce, přičemž v jedné byla vynechána reverzní transkriptáza pro získání negativní kontroly.

RNA byla odstraněna štěpením alkalickou hydrolýzou s přidavkem 1 μ l 0,5M EDTA a následně 12,5 μ l 0,2M NaOH, před inkubací při 68 °C 5 min. Reakce byla neutralizována přidáním 12,5 μ l 1M Tris-HCl (pH 7,4) a vysrážena přidáním 20 μ g glykogenu (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Německo), 5 μ l 3M octanu sodného a 60 μ l isopropanolu. Oba vzorky byly resuspendovány ve 20 μ l pufru TE 10 : 1 (10mM Tris-HCl, pH 7,4; 1mM EDTA, pH 8).

Pro ukotvení kotevního oligonukleotidu DT88 (viz tabulka níže), který byl fosforylován na 5'-konci a blokován ddCTP na 3'-konci byla použita T4-RNALigáza. Byly provedeny dvě paralelní ligace přes noc při laboratorní teplotě, přičemž každá reakce obsahovala: 1,3 μ l pufru 10 x pro RNALigázu (Roche Molecular Biochemicals), 0,4 μ M DT88, 10 μ l buď cDNA nebo RT kontrolního vzorku a 3 U T4 RNALigázy. Jako negativní kontroly byla provedena druhá sada ligačních reakcí s vynecháním T4 RNALigázy. Získané ligační reakční směsi byly použity přímo bez čištění při následné PCR.

cDNA s navázanou ukotvovací oblastí byla amplifikována použitím kombinace PCR typů „hemi-nested“ a „hot-started“ pro zvýšení specificity a výtěžku produktu. Na reakčních směsích RT/ligáza byly provedeny čtyři oddělené PCR prvního stupně a kontroly v objemu 30 μ l, vždy s obsahem: 3 μ l pufru 10 x Taq Platinum, 3 μ l 25mM $MgCl_2$, 1 μ l 10mM dNTP, 10 pmol každého z primerů a 1 μ l odpovídající ligační reakční směsi RNA. PCR byla zahájena za horka použitím DNA polymerázy Taq Platinum (Life Technologies) (přidány 2 U). První ligačně ukotvená PCR (ligation-anchored PCR, LA-PCR) byla provedena použitím 10 pmol jak primeru DT89 specifického pro ukotvovací oblast, tak i primeru p1-2 specifického pro transkript (viz tabulka níže), který je vnitřní vzhledem k 3'-konci RT primeru porA3. PCR byla prováděna použitím počátečního kroku 95 °C 5 min (pro aktivaci DNA polymerázy) s následnými 10 cykly při 90 °C 10 s a 70 °C 1 min (snižováno 1 stupeň na cykl), 15 cyklů při 90 °C 10 s a 60 °C 1 min. Druhá „hemi-nested“ LA-PCR byla provedena za stejných podmínek s použitím primeru DT89 a vnitřního primeru p1-2, spolu s 10 pmol p1-1 (viz tabulka níže) a 1 μ l PCR prvního stupně. Amplifikační produkty byly vyčištěny použitím soupravy QIAGEN „QIAquick PCR purification“ kit podle instrukcí výrobce před provedením sekvenování.

Pro sekvenování produktů RACE PCR byl použit kit CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Beckman, Francie) s použitím

10 pmol primeru p1-1. Sekvenační reakce byly prováděny podle poskytnutých instrukcí a sekvenační produkty byly analyzovány na analytickém systému Ceq2000 DNA Analysis System (Beckman-Coulter).

DT88	5'GAAGAGAAGGTGGAAATGGCGTTTTGGC3'
DT89	5'CCAAAACGCCATTTCCACCTTCTCTTC3'
porA3	5'CCAAATCCTCGCTCCCCTTAAAGCC3'
p1-2	5'CGCTGATTTTCGTCCTGATGCGGC3'
p1-1	5'GGTCAATTGCGCCTGGATGTTCTG3'

Výsledky pro promotor *porA* *Neisseria meningitidis*

Počátek transkripce *porA*-mRNA pro *Neisseria meningitidis* séro skupiny B (kmen H44/76) byl mapován do místa 59 bp proti směru transkripce vzhledem k startovacímu kodonu ATG použitím popsaneho postupu 5'-RACE. Výsledek potvrzuje mapování provedené prodloužením primeru a publikované van der Endem a dalšími (1995). Tento výsledek podporuje myšlenku, že fragment DNA obsahující nukleotidy -9 až -259 vzhledem k *porA* ATG je vhodný pro dosažení silné exprese genu v *Neisseria meningitidis* a pravděpodobně i v dalších druzích bakterií, jako je *Haemophilus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*.

Výsledky pro promotor *porB* *Neisseria meningitidis*

Stejná experimentální strategie byla použita pro mapování místa zahájení transkripce *porB* u *Neisseria meningitidis* séro skupiny B (kmen H44/76). Primery uvedené v následující tabulce odpovídají 3'-konci primeru RT (*porB3*), primeru specifickému pro transkript, který je vnitřní vzhledem k *porB3* (*porB2*) a vnitřní vzhledem k *porB2* (*porB1*).

porB3, porB2 a porB1 jsou umístěny 265 bp, 195 bp, popřípadě 150 bpve směru transkripce vzhledem ke startovacímu kodonu ATG.

porB1	5'GGTAGCGGTTGTAACCTTCAGTAACTT3'
porB2	5'GTCTTCTTGGCCTTTGAAGCCGATT3'
porB3	5'GGAGTCAGTACCGGCGATAGATGCT3'

Použitím primerů porB1 a DT89 byl získán amplikon PCR o délce přibližně 200 bp provedením mapování 5'-RACE. Protože porB1 je umístěn 150 bp od startovacího kodonu ATG *porB* tento výsledek podporuje myšlenku, že místo zahájení transkripce *porB* je umístěno přibližně 50 bp ($\pm$ 30 bp) proti směru transkripce vzhledem k *porB* ATG.

Přesný nukleotid odpovídající počátku transkripce se v současnosti zjišťuje sekvenováním DNA. Výše uvedený výsledek PCR podporuje domněnku, že fragment DNA obsahující nukleotidy -1 až -250 vzhledem ke startovacímu kodonu ATG *porB* je vhodný pro řízení silné genové exprese v *Neisseria meningitidis* a pravděpodobně i v jiných bakteriálních druzích, jako je *Haemophilus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*.

Příklad 10

Regulace pro zvýšení exprese genu *Omp85* *N. meningitidis* séro skupiny B náhradou promotoru

Cílem tohoto experimentu bylo nahradit endogenní promotorovou oblast genu D15/*Omp85* silným promotorem *porA* s cílem řídit produkci antigenu D15/*Omp85* ke zvýšení exprese. Pro tento účel byl zkonstruován plasmid pro náhradu promotoru s použitím metod pro klonování *E. coli*. Oblast DNA (1000 bp) umístěná proti

směru transkripce vzhledem ke kódujícímu genu *D15/omp85* byla objevena (SEQ ID NO: 3) v soukromé databázi Incyte PathoSeq obsahující neukončené sekvenční genomových DNA kmene *Neisseria meningitidis* ATCC 13090. Hlavní kroky tohoto postupu jsou znázorněny v obr. 9. Ve stručnosti, fragment DNA (1000 bp) pokrývající nukleotidy -48 až -983 vzhledem ke startovacímu kodonu (ATG) genu *D15/Omp85* byl amplifikován PCR použitím oligonukleotidů **ProD15-51X** (5'-GGG CGA ATT CGC GGC CGC CGT CAA CGG CAC ACC GTT G-3') a **ProD15-52** (5'-GCT CTA GAG CGG AAT GCG GTT TCA GAC G-3') obsahujících restrikční místa *EcoRI*, popřípadě *XbaI* (podtržená). Tento fragment byl restrikčně štěpen a vložen do plasmidu pUC18 štěpeného stejnými enzymy. Získaný konstrukt byl vystaven mutagenézi *in vitro* použitím soupravy Genome Priming system (s použitím donorového plasmidu pGPS2), komerčně dodávané firmou New England Biolabs (MA, USA). Byla provedena selekce kmenů s vloženým minitransposonem (odvozeným od Tn7 a nesoucím gen rezistence na chloramfenikol). Byl izolován a pro další studie použit jeden klon obsahující vložený minitransposon umístěný v 5'obklopující oblasti *d15/Omp85*, 401 bp ve směru transkripce vzhledem k místu *EcoRI*. Tento plasmid byl vystaven kruhové PCR mutagenézi (Jones & Winistofer (1992), Biotechniques 12: 528 - 534) s cílem (i) odstranit opakující se sekvenci DNA (Tn7R) vytvořenou transkripčním procesem, (ii) vložit sekvenční pro příjem meningokoků nutné pro transformaci, a (iii) vložit vhodná restrikční místa umožňující klonování cizího materiálu DNA, jako jsou promotory. Kruhová PCR byla prováděna použitím **TnRD15-KpnI/XbaI+US** (5'-CGC CGG TAC CTC TAG AGC CGT CTG AAC CAC TCG TGG ACA ACC C-3') a **TnR03Cam(KpnI)** (5'-CGC CGG TAC CGC CGC TAA CTA TAA CGG TC-3') oligonukleotidů obsahujících příjmové sekvenční a vhodná restrikční místa (*KpnI* a *XbaI*, podtrženo). Výsledný fragment PCR byl čištěn na gelu, štěpen *Asp718* (isoschizomer *KpnI*) a vložen do fragmentu 184 bp DNA obsahujícího promotor *porA* a vytvořeného

PCR s použitím oligonukleotidů **PorA-01** (5'-CGC CGG TAC CGA GGT CTG CGC TTG AAT TGT G-3') a **PorA02** (5'-CGC CGG TAC CTC TAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') obsahujících restrikční místa *KpnI*. Byla provedena selekce rekombinantních klonů nesoucích promotor *porA* ve správné orientaci (transkripce probíhá ve směru od *EcoRI* k *XbaI*), které byly použity pro transformaci kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího obalový polysacharid (*cps*-) a jeden z hlavních proteinů vnější membrány PorA (*porA*-). Rekombinantní klony *Neisseria meningitidis* vzniklé dvojitým crossing-overem (screening PCR použitím oligonukleotidů **Cam-05** (5'-GTA CTG CGA TGA GTG GCA GG-3') a **proD15-52**) byly selektovány na médiu GC obsahujícím 5 µg/ml chloramfenikolu a byly analyzovány na expresi D15/Omp85. Jak je ukázáno na obr. 10, produkce D15/Omp85 byla podstatně zvýšena v celkových proteinových extraktech kmenů *Nm* pocházejících z náhrady promotoru ve srovnání s rodičovským kmenem (*cps*-). Tento výsledek byl také pozorován při analýze váčků vnější membrány připravených ze stejných kmenů (viz obr. 17). Tyto výsledky je možno připisovat náhradě endogenního promotoru *D15* silným promotorem *porA*. Navíc bylo překvapivě zjištěno, že exprese byla v případě, kdy byl promotor *porA* vložen přibližně 400 bp proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu, přibližně 50 x vyšší než v případě, kdy byl promotor umístěn do vzdálenosti přibližně 100 bp proti směru transkripce. Tyto experimenty také podporují přesvědčení, že strategie náhrady promotoru funguje a umožní řízení pro zvýšení syntézy vnějších integrálních membránových proteinů ve váčkách vnější membrány.

Některé geograficky izolované lidské populace (jako například Kuba) jsou infikovány omezeným počtem izolátů *Neisseria meningitidis* náležejících z větší části k jednomu nebo několika typům proteinů vnější membrány. Protože PorA je hlavním proteinovým antigenem vnější membrány, který může indukovat ochranné a pro kmen specifické baktericidní protilátky, může být možné propůjčit vakcíně

schopnost ochrany v takových populacích použitím omezeného počtu sérotypů PorA. Navíc může PorA interagovat s nebo stabilizovat některé další proteiny vnější membrány. V této souvislosti může být výhodná přítomnost PorA ve váčkách vnější membrány, protože zvyšuje vakcinační účinnost těchto rekombinantním způsobem zlepšených váčků.

Z tohoto důvodu může být žádoucí regulovat expresi vnějšího membránového proteinu D15/Omp85 směrem ke zvýšení exprese v kmenu *Neisseria meningitidis* séroskupiny B postrádajícím funkční geny *cps*, ale exprimujícím PorA. Genomická DNA byla extrahována z rekombinantního kmene *Neisseria meningitidis* séroskupiny B *cps*-, *porA*-, D15/Omp85+ s použitím soupravy QIAGEN Genomic Tips 100-G kit. 10 µg tohoto materiálu bylo linearizováno a použito pro transformaci *Neisseria meningitidis* séroskupiny B *cps*- podle klasického protokolu transformace. Rekombinantní *Neisseria* byla získána na agarových plotnách GC obsahujících 5 µg/ml chloramfenikolu.

Integrace pocházející z dvojitého crossing-overu proti směru transkripce genu *D15* byla testována PCR, jak bylo popsáno dříve. Protože homologní rekombinace se mohou vyskytnout kdekoli v chromosomu, byl proveden druhý screening PCR pro kontrolu integrity místa *porA* v rekombinantním kmenu. K tomu účelu byly použity vnitřní primery *porA* **PPA1** (5-GCG GCC GTT GCC GAT GTC AGC C-3') a **PpA2** (5-GGC ATA GCT GAT GCG TGG AAC TGC-3') při experimentu PCR screeningu. Amplifikace fragmentu 1170 bp potvrzuje přítomnost genu *porA* v rekombinantní bakterii.

Rekombinantní bakterie (množství odpovídající přibližně 5×10^8 bakterií) mohou být resuspendovány v 50 µl pufru PAGE-SDS, zmrazeny (-20 °C)/vařeny (100 °C) třikrát a potom děleny elektroforézou PAGE-SDS na 12,5% gelu. Gely potom mohou být barveny Coomassie Brilliant blue R250 nebo převedeny na

nitrocelulózovou membránu a testovány buď monoklonální protilátkou anti-porA nebo králičí polyklonální protilátkou anti-D15/Omp85. Může být také provedena analýza váčků vnější membrány připravených ze stejných kmenů.

Příklad 11

Regulace pro zvýšení exprese proteinového antigenu Hsf v rekombinantním kmenu *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícím funkční geny *cps*, ale exprimujícím *PorA*

Jak je uvedeno výše, v některých zemích může být přítomnost *PorA* ve váčkách vnější membrány výhodná a může zesilovat účinnost vakcíny založené na zlepšených rekombinantních váčkách. V následujícím příkladu používali autoři vynálezu modifikovaný vektor pCMK(+) pro regulaci pro zvýšení exprese proteinového antigenu Hsf v kmenu postrádajícím funkční geny *cps*, ale exprimujícím *PorA*. Původní vektor pCMK(+) obsahuje chimérní promotor *porA/lacO* reprimovaný v hostitelské *E. coli* exprimující *lacI^q*, ale transkripčně aktivní v *Neisseria meningitidis*. V modifikovaném pCMK(+) byl použit nativní promotor *porA* pro řízení transkripce genu *hsf*. Gen kódující Hsf byl amplifikován PCR použitím oligonukleotidových primerů HSF01-*NdeI* a HSF02-*NheI*, které jsou uvedeny v následující tabulce. V důsledku sekvence primeru HSF01-*NdeI* bude exprimovaný protein Hsf obsahovat dva methioninové zbytky na 5'-konci. Pro amplifikaci PCR byly použity podmínky popsané dodavatelem (HiFi DNA polymerase, Boehringer Mannheim, GmbH). Teplotní cyklování bylo následující: 25 x (94 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 3 min) a 1 x (72 °C 10 min, 4 °C až do izolace). Odpovídající amplikon byl potom klonován do odpovídajících restričních míst dodávacího vektoru pCMK(+). V tomto rekombinantním plasmidu označeném pCMK(+)-Hsf byl vypuštěn *lacO* přítomný v chimérním promotoru *porA/lacO* strategií

rekombinantní PCR (viz obr. 12). Plasmid pCMK(+)-Hsf byl použit jako templát pro amplifikaci dvou oddělených fragmentů DNA PCR:

-fragment 1 obsahuje 5'rekombinogenní oblast *porA*, gen rezistence na kanamycin a promotor *porA*. Použité oligonukleotidové primery, RP1 (SacII) a RP2, jsou ukázány v následující tabulce. Primer RP1 je homologní se sekvencí právě proti směru transkripce vzhledem k operátoru *lac*.

-fragment 2 obsahuje Shine-Dalgarnovu sekvenci genu *porA*, gen *hsf* a 3'rekombinogenní oblast *porA*. Použité oligonukleotidové primery, RP3 a RP4 (*Apa*I), jsou uvedeny v následující tabulce. Primer RP3 je homologní sekvenci právě ve směru transkripce vzhledem k operátoru *lac*. 3'-konec fragmentu 1 a 5'-konec fragmentu 2 obsahují 48 překrývajících se bází. Pro konečnou reakci PCR použitím primerů RP1 a RP4 bylo použito 500 ng z každé PCR (1 a 2). Konečný získaný amplikon byl subklonován do vektoru pSL1180 štěpeného enzymy SacII a *Apa*I. Modifikovaný plasmid pCMK(+)-Hsf byl ve velkém měřítku čištěn pomocí soupravy QIAGEN maxiprep kit a 2 µg tohoto materiálu byly použity pro transformaci kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího funkční geny *cps* (kmen popsáný v příkladu 1). Pro uchování exprese *porA* byla provedena selekce integrace pocházející z jediného děje crossing-over kombinací postupů PCR a westernového přenosu. Klony rezistentní na kanamycin testované pozitivně PCR specifickou pro *porA* a westernovými přenosy byly uchovávány při -70 °C ve formě zásobních roztoků v glycerolu a použity pro další studie. Bakterie (množství odpovídající přibližně 5 x 10⁸ bakterií) byly resuspendovány v 50 µl pufru PAGE-SDS, zmrazeny (-20 °C)/vařeny (100 °C) třikrát a potom byly odděleny elektroforézou PAGE-SDS na 12,5% gelu. Exprese Hsf byla vyšetřována v lyzátech úplných bakteriálních buněk (WCBL) odvozených z *NmB* (Cps-, PorA+) nebo *NmB* (Cps-, PorA+, Hsf+). Barvení Coomassie detekovalo podstatné zvýšení exprese Hsf (vzhledem k endogenní hladině Hsf) (viz obr. 13). Tento výsledek potvrzuje, že modifikovaný vektor

pCMK(+)-Hsf je funkční a může být úspěšně použit pro regulaci ke zvýšení exprese proteinů vnější membrány, aniž by se zastavila produkce hlavního proteinového antigenu vnější membrány PorA.

Oligonukleotidy používané při těchto experimentech

Oligonukleotidy	Sekvence	Poznámky
Hsf01-Nde	5'-GGA ATT CCA TAT GAT GAA CAA AAT ATA CCG C-3'	Klonovací místo <i>Nde</i> I
Hsf02-Nhe	5'-GTA GCT AGC TAG CTT ACC ACT GAT AAC CGA C-3'	Klonovací místo <i>Nhe</i> I
GFP-mut-Asn	5'-AAC TGC AGA ATT AAT ATG AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3'	Klonovací místo <i>Asn</i> I kompatibilní s <i>Nde</i> I
GFP-Spe	5'-GAC ATA CTA GTT TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG-3'	Klonovací místo <i>Spe</i> I kompatibilní s <i>Nhe</i> I
RP1 (<i>Sac</i> II)	5'-TCC CCG CGG GCC GTC TGA ATA CAT CCC GTC-3'	Klonovací místo <i>Sac</i> II
RP2	5'-CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG TCT TCA-3'	
RP3	5'-AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC TCA AAT TTA CAA AAG GAA GCC CAT ATG-3'	
RP4 (<i>Ap</i> aI)	5'-GGG TAT TCC GGG CCC TTC AGA CGG CGC AGC AGG-3'	Klonovací místo <i>Ap</i> aI

Příklad 12

Expresse zeleně fluoreskujícího proteinu Green Fluorescent Protein v rekombinantním kmenu *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícím funkční geny cps, ale exprimujícím PorA

V následujícím příkladu byl použit vektor pCMK pro testování exprese cytoplasmatického heterologního proteinu v *Neisseria*

meningitidis. Zeleně fluoreskující protein (Green Fluorescent Protein) byl amplifikován z plasmidu pKen-Gfpmut2 s použitím primerů GFP-Asnmut2 a GFP-Spe (viz tabulka v příkladu 11). AsnI poskytuje kohesivní konce kompatibilní s *NdeI*, SpeI poskytuje kohesivní konce kompatibilní s *NheI*. Pro amplifikaci PCR byly použity podmínky popsané dodavatelem (HiFi DNA polymerase, Boehringer Mannheim, GmbH). Cyklování teploty bylo následující: 25 x (94 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 3 min) a 1 x (72 °C 10 min, 4 °C až do izolace). Odpovídající amplicon byl následně klonován do dodávacího vektoru pCMK(+) štěpeného restrikčními enzymy *NdeI* a *NheI*. V tomto rekombinantním plasmidu označeném pCMK(+)-GFP byl vypuštěn *lacO* přítomný v chimérickém promotoru *porA/lacO* strategií rekombinantní PCR. Plasmid pCMK(+)-GFP byl použit jako templát pro PCR amplifikaci dvou oddělených fragmentů DNA:

-fragment 1 obsahoval 5' rekombinogenní oblast *porA*, gen rezistence na kanamycin a promotor *porA*. Jako oligonukleotidové primery byly použity RP1 (*SacII*) a RP2 (viz tabulka v příkladu 11). Primer RP1 je homologní se sekvencí právě proti směru transkripce vzhledem k *lac* operátoru.

-fragment 2 obsahuje *PorA* Shine-Dalgarnovu sekvenci, gen *gfp* a 3' rekombinogenní oblast *porA*. Použité oligonukleotidové primery RP3 a RP4 (*Apal*) jsou přítomny v tabulce v příkladu 11. Primer RP3 je homologní se sekvencí právě ve směru transkripce vzhledem k *lac* operátoru.

3'-konec fragmentu 1 a 5'-konec fragmentu 2 mají 48 překrývajících se bází. 500 ng z každé PCR (1 a 2) bylo použito pro konečnou reakci PCR s použitím primerů RP1 a RP4. 20 µg tohoto fragmentu PCR bylo použito pro transformaci kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího funkční geny *cps*.

Transformace lineární DNA je méně účinná než transformace kruhovou plasmidovou DNA, ale u všech získaných rekombinantů

došlo ke dvojitému crossing-overu (potvrzeno kombinací screeningových postupů PCR a westernového přenosu). Klony rezistentní na kanamycin byly uchovávány při -70 °C jako glycerolové zásobní roztoky a byly používány pro další studie. Bakterie (množství odpovídající přibližně 5×10^8 bakterií) byly resuspendovány v 50 µl pufru PAGE-SDS, zmraženy (-20 °C)/vařeny (100 °C) třikrát a potom byly děleny elektroforézou PAGE-SDS na 12,5% gelu.

Expresí GFP byla testována v lyzátech úplných bakteriálních buněk (WCBL) odvozených od *NmB* (Cps-, PorA+) nebo *NmB* (Cps-, PorA-, GFP+). Barvení Coomassie detekovalo expresi GFP, která nebyla přítomná v recipientním kmenu *Neisseria meningitidis* (viz obr. 14).

Příklad 13

Regulace ke zvýšení exprese genu *NspA* *N. meningitidis* séroskupiny B náhradou promotoru

Cílem tohoto experimentu bylo nahradit endogenní promotorovou oblaast genu *NspA* silným promotorem *porA*, aby bylo možno regulovat produkci antigenu *NspA* směrem ke zvýšení exprese. K tomuto účelu byl zkonstruován plasmid pro náhradu promotoru s použitím metod klonování *E. coli*. Byla objevena oblast DNA (924 bp) umístěná proti směru transkripce vzhledem ke kódujícímu genu *NspA* (SEQ ID NO: 7) v soukromé databázi Incyte PathoSeq obsahující nedokončené genomové sekvence DNA kmene *Neisseria meningitidis* ATCC 13090. Fragment DNA (675 bp) pokrývající nukleotidy -115 až -790 vzhledem ke startovacímu kodonu genu *NspA* (ATG) byl amplifikován PCR použitím oligonukleotidů **PNS1'** (5'-CCG CGA ATT CGA CGA AGC CGC CCT CGA C-3') a **PNS2** (5'-CGT CTA GAC GTA GCG GTA TCC GGC TGC-3') obsahujících štěpicí místa *EcoRI* a *XbaI* (podtržená). Fragment PCR byl štěpen *EcoRI* a *XbaI* a vložen do pUC18. Tento plasmid byl vystaven kruhové mutagenézi PCR (Jones

& Winistofer (1992), *Biotechniques* 12: 528 - 534) s cílem vložit příjmové meningokokové sekvence nutné pro transformaci a vhodná restrikční místa umožňující klonování promotorové kazety *CmR/PorA*. Kruhová PCR byla provedena použitím oligonukleotidů **BAD01-2** (5'-GGC GCC CGG GCT CGA GCT TAT CGA TGG AAA ACG CAG C-3') a **BAD02-2** (5'-GGC GCC CGG GCT CGA GTT CAG ACG GCG CGC TTA TAT AGT GGA TTA AC-3') obsahujících příjmové sekvence a vhodná restrikční místa (*Xma*I a *Xho*I), která jsou podtržena. Získaný fragment PCR byl čištěn na gelu a štěpen *Xho*I. Promotorová kazeta *CmR/PorA* byla amplifikována z dříve popsaneho plasmidu pUC D15/Omp85 s použitím primerů **BAD 15-2** (5'-GGC GCC CGG GCT CGA GTC TAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') a **BAD 03-2** (5'-GGC GCC CGG GCT CGA GCA CTA GTA TTA CCC TGT TAT CCC-3') obsahujících vhodná restrikční místa (*Xma*I, *Xba*I, *Spe*I a *Xho*I), která jsou podtržena. Získaný fragment PCR byl štěpen a vložen do kruhového plasmidu PCR rozštěpeného odpovídajícími enzymy. 10 µg rekombinantního plasmidu bylo linearizováno a použito pro transformaci kmene *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícího kapsulární polysacharid (*cps*-) a jeden z hlavních proteinů vnější membrány - PorA (*porA*-). Rekombinantní klony *Neisseria meningitidis* pocházející z události dvojitého crossing-overu (PCR screening použitím oligonukleotidů **BAD 25** (5'-GAG CGA AGC CGT CGA ACG C-3') a **BAD08** (5'-CTT AAG CGT CGG ACA TTT CC-3')) byly selektovány na agarových plotnách GC obsahujících 5 µg/ml chloramfenikolu a byly analyzovány na expresi NspA. Rekombinantní bakterie (odpovídající přibližně 5×10^8 bakterií) byly resuspendovány v 50 µl pufru PAGE-SDS, zmrazeny (-20 °C)/vařeny (100 °C) třikrát a potom byly děleny elektroforézou PAGE SDS na 12,5% gelu. Gely byly potom barveny Coomassie Brilliant blue R250 nebo převedeny na nitrocelulózovou membránu a testovány buď monoklonální protilátkou anti-PorA nebo polyklonální protilátkou anti-NspA (obr. 17). Jako v případě Omp85 bylo překvapivě ukázáno, že vložení promotoru

přibližně 400 bp proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu NspA poskytne větší expresi proteinu, než při umístění do vzdálenosti přibližně 100 bp proti směru transkripce.

Stejný rekombinantní plasmid pUC může být použit pro regulaci ke zvýšení exprese NspA v kmenu *Neisseria meningitidis* séro skupiny B postrádajícím funkční gen *cps*, ale stále ještě exprimující PorA.

Příklad 14

Regulace pro zvýšení exprese genu *pldA* (*omplA*) *N. meningitidis* séro skupiny B náhradou promotoru

Účelem tohoto experimentu bylo nahradit endogenní promotorovou oblast genu *pldA* (*omplA*) silným promotorem *porA* s cílem dosáhnout zvýšení produkce antigenu PldA (OmplA1). K tomuto účelu byl zkonstruován plasmid pro náhradu promotoru s použitím metod klonování *E. coli*. Byla objevena oblast DNA (373 bp) umístěná proti směru transkripce vzhledem ke kódující sekvenci *pldA* (SEQ ID NO: 18) v soukromé databázi Incyte PathoSeq kmene *Neisseria meningitidis* ATCC 13090. Tato DNA obsahuje sekvenci kódující domnělý gen *rpsT*. Stop kodon *rpsT* je umístěn 169 bp proti směru transkripce vzhledem k ATG *pldA*. Pro zabránění poškození tohoto potenciálně důležitého genu se autoři vynálezu rozhodli vložit promotorovou kazetu *CmR/PorA* právě proti směru transkripce vzhledem k ATG genu *pldA*. K tomuto účelu byl amplifikován fragment DNA o délce 992 bp odpovídající genu *rpsT*, intergenní sekvence 169 bp a prvních 499 nukleotidů genu *pldA* amplifikován PCR z genomové DNA *Neisseria meningitidis* séro skupiny B použitím oligonukleotidů **PLA1 Amo5** (5'-GCC GTC TGA ATT TAA AAT TGC GCG TTT ACA G-3') a **PLA1 Amo3** (5'-GTA GTC TAG ATT CAG ACG GCG CAA TTT GGT TTC CGC AC-3') obsahujících příjmové sekvence (podtrženy). PLA1 Amo3 obsahuje také restriční místo *XbaI*. Tento fragment PCR byl vyčištěn soupravou High Pure Kit (Roche,

Mannheim, Německo) a přímo klonován do vektoru pGemT (Promega, USA). Tento plasmid byl vystaven mutagenезi kruhovou PCR (Jones & Winistofer, 1992) s cílem vložit vhodná restrikční místa umožňující klonování promotorové kazety *CmR/PorA*. Kruhová PCR byla provedena použitím oligonukleotidů **CIRC1-Bgl** (5'CCT AGA TCT CTC CGC CCC CCA TTG TCG-3') a buď **CIRC1-XH-RBS/2** (5'-CCG CTC GAG TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGA ATA TAC GGA ATA TGC G-3') nebo **CIRC2-XHO/2** (5'-CCG CTC GAG ATG AAT ATA CGG AAT-3') obsahujících vhodná restrikční místa (*Bgl*II a *Xho*I), která jsou podtržena. Promotorová kazeta *CmR/PorA* byla amplifikována z dříve popsaného plasmidu pUC D15/Omp85 s použitím primerů **BAD20** (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') a **CM-PORA-3** (5'-CCG CTC GAG ATA AAA ACC TAA AAA CAT CGG GC-3') obsahujících vhodná restrikční místa (*Bgl*II a *Xho*I) (podtržená). Tento fragment PCR byl klonován do kruhového plasmidu PCR získaného použitím primerů CIRC1-Bgl a CIRC1-XH-RBS/2. Tento plasmid může být použit pro transformaci kmenů *Neisseria meningitidis* séroskupiny B (*cps*-) a (*cps*- *porA*-). Integrace procesem dvojitého crossing-overu v oblasti proti směru transkripce vzhledem k *pldA* směřuje vložení promotoru *porA* přímo proti směru transkripce vzhledem ke kodonu ATG *pldA*. Další kazeta byla amplifikována z genomické DNA rekombinantní bakterie *Neisseria meningitidis* séroskupiny B (*cps*-, *porA*-, D15/Omp85+) s nadměrnou expresí D15/Omp85 náhradou promotoru. Tato kazeta obsahuje gen *cmR*, promotor *porA* a 400 bp odpovídajících 5' obklopující oblasti genu *D15/Omp85*. Ukázalo se, že tato sekvence je účinná pro regulaci ke zvýšení exprese D15/Omp85 v bakterii *Neisseria* a bude provedeno testování na regulaci ke zvýšení exprese dalších antigenů *Neisseria*. Pro amplifikaci byly použity primery **BAD 20** a **CM-PORA-D15/3** (5'-CGG CTC GAG TGT CAG TTC CTT GTG GTG C-3') obsahující restrikční místa *Xho*I (podtrženo). Tento fragment PCR byl klonován do kruhového plasmidu PCR získaného použitím primerů CIRC1-Bgl a

CIRC2-XHO/2. Tento plasmid byl použit pro transformaci kmenů *Neisseria meningitidis* séroskupiny B (*cps*-) a (*cps*-, *porA*-). Integrace pomocí dvojitého crossing-overu v oblasti proti směru transkripce vzhledem k *pldA* nasměruje vložení promotoru *porA* do oblasti 400 bp proti směru transkripce vzhledem k ATG *pldA*.

Příklad 15

Regulace ke zvýšení exprese genu *tbpA* *N. meningitidis* séroskupiny B náhradou promotoru

Cílem tohoto experimentu bylo nahradit endogenní promotorovou oblast genu *tbpA* silným promotorem *porA* s cílem dosáhnout regulaci ke zvýšení produkce antigenu TbpA. Pro tento účel byl zkonstruován plasmid pro náhradu promotoru použitím metod klonování *E. coli*. Oblast DNA (731 bp) umístěná proti směru transkripce vzhledem ke kódující sekvenci *tbpA* byla objevena (SEQ ID NO: 17) v soukromé databázi Incyte PathoSeq kmene *Neisseria meningitidis* ATCC 13090. Tato DNA obsahuje sekvenci kódující antigen TbpB. Geny jsou organizovány v operonu. Gen *tbpB* bude odstraněn a nahrazen promotorovou kazetou *CmR/porA*. K tomuto účelu byla nejprve provedena amplifikace PCR fragmentu DNA 3218 bp odpovídajícího 5' obklopující sekvenci 509 bp genu *tbpB*, kódující sekvence 2139 bp genu *tbpB*, intergenní sekvence 87 bp a 483 prvních nukleotidů kódující sekvence *tbpA* z genomické DNA *Neisseria meningitidis* séroskupiny B použitím oligonukleotidů **BAD16** (5'-GGC CTA GCT AGC CGT CTG AAG CGA TTA GAG TTT CAA AAT TTA TTC-3') a **BAD17** (5'-GGC CAA GCT TCA GAC GGC GTT CGA CCG AGT TTG AGC CTT TGC-3') obsahujících příjmové sekvence a restrikční místa *NheI* a *HindIII* (podtržená). Tento fragment PCR byl čištěn soupravou High Pure Kit (Boehringer Mannheim, Německo) a přímo klonován do vektoru pGemT (Promega, USA). Tento plasmid byl vystaven mutagenезi cirkulární PCR (Jones a Winistofer (1992) s cílem (i) vložit vhodná restrikční místa umožňující klonování

promotorové kazety *CmR/PorA*, a (ii) odstranit 209 bp 5' obklopující oblasti *tbpB* a kódující sekvenci *tbpB*. Byla provedena kruhová PCR s použitím oligonukleotidů **BAD 18** (5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') a **BAD 19** (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G-3') obsahujících vhodná restrikční místa *XmaI*, *BglII* a *XhoI* (podtržená). Promotorová kazeta *CmR/PorA* byla amplifikována z výše popsaného plasmidu pUC D15/Omp85 s použitím primerů **BAD21** (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') a **BAD20** (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') obsahujících vhodná restrikční místa *XmaI*, *SpeI*, *BglII* a *XhoI* (podtržená). Tento fragment PCR byl klonován do plasmidu získaného kruhovou PCR. Tento plasmid se bude používat pro transformaci kmenů *Neisseria meningitidis* séroskupiny B (*cps*-) a (*cps*- *porA*-). Integrace procesem dvojitého crossing-overu v oblasti proti směru transkripce vzhledem ke genu *tbpA* bude směřovat vložení promotoru *porA* přímo proti směru transkripce vzhledem ke kodonu ATG *tbpA*.

Příklad 16

Regulace ke zvýšení exprese genu *pilQ* *N. meningitidis* séroskupiny B náhradou promotoru

Cílem tohoto experimentu bylo nahradit endogenní promotorovou oblast genu *pilQ* silným promotorem *porA* pro dosažení zvýšení produkce antigenu PilQ. K tomuto účelu byl zkonstruován plasmid pro náhradu promotoru s použitím metod klonování *E. coli*. Byla objevena oblast DNA (772 bp) umístěná proti směru transkripce vzhledem ke genu kódujícímu *pilQ* (SEQ ID NO: 12) v soukromé databázi Incyte PathoSeq kmene *Neisseria meningitidis* ATCC 13090. Tato DNA obsahuje sekvenci kódující antigen PilP. Gen *pilQ* je částí operonu, který si autoři vynálezu nepřáli poškodit, protože piliny jsou

nezbytné prvky bakterií. Promotorová kazeta *CmR/porA* byla vložena proti směru transkripce vzhledem ke genu *pilQ* pomocí stejné strategie, jako byla popsána pro zvýšení exprese genu *pIdA*. K tomu účelu byl pomocí PCR amplifikován fragment DNA 866 bp odpovídající 3'-části kódující sekvence *pilP*, intergenní sekvence 18 bp a 392 prvních nukleotidů genu *pilQ*, z genomické DNA *Neisseria* séroskupiny B, s použitím oligonukleotidů **PQ-rec5-Nhe** (5'-CTA GCT AGC GCC GTC TGA ACG ACG CGA AGC CAA AGC-3') a **PQ-rec3-Hin** (GCC AAG CTT TTC AGA CGG CAC GGT ATC GTC CGA TTC G-3') obsahujících příjmové sekvence a restriční místa *NheI* a *HindIII* (podtržená). Tento fragment PCR byl přímo klonován do vektoru pGemT (Promega, USA). Tento plasmid byl vystaven mutagenезi kruhovou PCR (Jones & Winistofer, 1992) s cílem vložit vhodná restriční místa umožňující klonování promotorové kazety *CmR/porA*. Kruhová PCR byla prováděna použitím oligonukleotidů **CIRC1-PQ-Bgl** (5'-GGA AGA TCT AAT GGA GTA ATC CTC TTC TTA-3') a buď **CIRC1-PQ-XHO** (5'-CCG CTC GAG TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGA TTA CCA AAC TGA CAA AAA TC-3'), nebo **CIRC2-PQ-X** (5'-CCG CTC GAG ATG AAT ACC AAA CTG ACA AAA ATC-3') obsahujících vhodná restriční místa *BglII* a *XhoI* (podtržená). Promotorová kazeta *CmR/porA* byla amplifikována z dříve popsaného plasmidu pUC D15/Omp85 s použitím primerů **BAD20** (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') a **CM-PORA-3** (5'-CCG CTC GAG ATA AAA ACC TAA AAA CAT CGG GCA AAC ACC C-3') obsahujících vhodná místa štěpení *BglII* a *XhoI* (podtržená). Tento fragment PCR byl klonován do plasmidu získaného kruhovou PCR pomocí primerů CIRC1-PQ-Bgl a CIRC1-PQ-XHO. Tento plasmid může být použit pro transformaci kmenů *Neisseria meningitidis* séroskupiny B (*cps*-) a (*cps*-, *porA*-). Integrace procesem dvojitého crossing-overu v oblasti proti směru transkripce vzhledem k *pilQ* bude směřovat vložení promotoru *porA* přímo proti směru transkripce vzhledem k ATG *pilQ*.

Další kazeta byla amplifikována z genomické DNA rekombinantní *Neisseria meningitidis* séroskupiny B (*cps*-, *porA*-, *D15/Omp85*+) s nadměrnou expresí *D15/Omp* náhrdou promotoru. Tato kazeta obsahuje gen *cmR*, promotor *porA* a 400 bp odpovídajících 5' obklopující oblasti genu *D15/Omp85*. Ukázalo se, že tato sekvence je účinná pro regulaci ke zvýšení exprese *D15/Omp85* v *Neisseria meningitidis* a bude provedeno testování na zvýšení exprese dalších antigenů *Neisseria*. Primery použité pro amplifikaci byly **BAD 20** a **CM-PORA-D153** (5'-GGG CTC GAG TGT CAG TTC CTT GTG GTG C-3') obsahující restrikční místa *Xho*I (podtržena). Tento fragment PCR byl klonován do plasmidu získaného kruhovou PCR pomocí primerů CIRC1-PQ-Bgl a CIRC2-PQ-X. Tento plasmid může být použit pro transformaci kmenů *Neisseria meningitidis* séroskupiny B (*cps*-) a (*cps*-, *porA*-). Integrace metodou dvojitého crossing-overu do oblasti proti směru transkripce vzhledem k *pilQ* bude směřovat vložení promotoru *porA* do oblasti 400 bp proti směru transkripce vzhledem ke kodonu ATG *pilQ*.

Příklad 17

Konstrukce kazety *kanR/sacB* pro zavedení „čistých“, neoznačených mutací do chromosomu *N. meningitidis*

Cílem tohoto experimentu je zkonstruovat univerzální kazetu DNA obsahující marker umožňující selekci pro pozitivní screening rekombinace do chromosomu *Neisseria meningitidis* (tj. gen *kanR*), a marker umožňující negativní selekci pro vypuštění kazety z chromosomu po rekombinaci (tj. gen *sacB*). Tímto způsobem se odstraní z chromosomu *Neisseria* jakákoli heterologní DNA zavedená v průběhu homologní rekombinace.

Fragment DNA obsahující gen *neoR* a *sacB* exprimovaný pod řízením svého vlastního promotoru byl získán štěpením plasmidu pIB279 (Blomfield I. C., Vaughn V., Rest R. F., Eisenstein B. I. (1991),

Mol. Microbiol 5: 1447 - 57) restriční enzymem *Bam*HI. Vektor pro příjem byl odvozen z výše popsaného plasmidu pCMK. Gen *kanR* plasmidu pCMK byl odstraněn štěpením enzymy *Nru*I a *Eco*RV. Tento plasmid byl nazván pCMKs. Kazeta *neoR/sacB* byla vložena do plasmidu pCMKs v místě štěpení *Bg*/II kompatibilním s konci *Bam*HI.

E. coli nesoucí tento plasmid není schopna růst v přítomnosti 2% sacharózy v kultivačním médiu, což potvrzuje funkčnost promotoru *sacB*. Plasmid obsahující rekombinogenní sekvence umožňující vložení kazety v místě *porA* ve chromosomu *Neisseria meningitidis* séroskupiny B. Rekombinantní *Neisseria* byla získána z agarových ploten GC obsahujících 200 µg/ml kanamycinu. Promotor *sacB* však bohužel nebyl v *Neisseria meningitidis* funkční; na agarových plotnách GC s obsahem 2% sacharózy nebyl pozorován žádný rozdíl v růstu.

Byla zkonstruována nová kazeta obsahující gen *sacB* pod řízením promotoru *kanR*. Byla provedena kruhová PCR použitím plasmidu pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech, USA) jako templátu s oligonukleotidy **CIRC-Kan-Nco** (5'-CAT GCC ATG GTT AGA AAA ACT CAT CGA GCA TC-3') a **CIRC-Kan-Xba** (5'-CTA GTC TAG ATC AGA ATT GGT TAA TTG GTT G-3') obsahujícími restriční místa *Nco*I a *Xba*I (podtržena). Výsledný fragment PCR byl čištěn na gelu, štěpen *Nco*I a vložen do genu *sacB* vytvořeného pomocí PCR z plasmidu pIB279 s oligonukleotidem **SAC/NCO/NEW5** (5'-CAT GCC ATG GGA GGA TGA ACG ATG AAC ATC AAA AAG TTT GCA A-3') obsahujícím restriční místo *Nco*I (podtrženo) a RBS (tučně) a oligonukleotidem **SAC/NCO/NEW3** (5'-GAT CCC ATG GTT ATT TGT TAA CTG TTA ATT GTC-3') obsahujícím restriční místo *Nco*I (podtrženo). Rekombinantní klony *E. coli* mohou být testovány na svou citlivost na agarových plotnách obsahujících 2% sacharózu. Nová kazeta *kanR/sacB* může být subklonována do pCMKs a použita pro transformaci kmene *Neisseria meningitidis* séroskupiny B *cps*-. Získaná citlivost na sacharózu bude u *Neisseria* potvrzena. Plasmid

pCMKs bude použit pro transformaci rekombinantní bakterie *kanR/SacB Neisseria* pro vypuštění celé kazety vložené do chromosomu v místě *porA*. Čistá rekombinantní *Neisseria* bude získána na plotnách s agarem GC obsahujících 2% sacharózu.

Příklad 18

Použití malých rekombinantních sekvencí (43 bp) pro umožnění homologní rekombinace ve chromosomu *Neisseria meningitidis*

Cílem tohoto experimentu je použití malých rekombinogenních sekvencí (43 bp) pro provádění inzercí, modifikací nebo delecí ve chromosomu *Neisseria*. Provedení tohoto experimentu značně usnadní další práci tím, že je možno se vyhnout subklonovacím krokům homologních sekvencí v *E. coli* (rekombinogenní sekvence 43 bp mohou být snadno přidány do primeru pro amplifikaci PCR). Gen *kanR* byl amplifikován PCR z plasmidu pUC4K pomocí následujících oligonukleotidů: **Kan-PorA-5** (5'-GCC GTC TGA ACC CGT CAT TCC CGC GCA GGC GGG AAT CCA GTC CGT TCA GTT TCG GGA AAG CCA CGT TGT GTC-3') obsahujícího 43 bp homologních s 5'-obklopující sekvencí genu *porA NmB* a příjmovou sekvencí (podtržena) a **Kan-PorA-3** (5'-TTC AGA CGG CGC AGC AGG AAT TTA TCG GAA ATA ACT GAA ACC GAA CAG ACT AGG CTG AGG TCT GCC TCG-3') obsahujícího 43 bp homologních s 3'-obklopující sekvencí genu *porA NmB* (tučně) a příjmovou sekvencí (podtrženo). Fragment DNA 1300 bp získaný tímto způsobem byl klonován do vektoru pGemT (Promega, USA). Tento plasmid může být použit pro transformaci kmene *Neisseria meningitidis* séroskupiny B *cps*-. Rekombinantní kmen *Neisseria* se získá na plotnách GC obsahujících 200 µg/ml kanamycinu. Integrace procesem dvojitého crossing-overu v místě *porA* bude testována screeningem metodou PCR s primery PPA1 a PPA2 tak jak bylo popsáno výše.

Příklad 19

Aktivní ochrana myši imunizovaných váčky *Neisseria meningitidis* standardního typu a rekombinantními

Zvířata byla třikrát imunizována (IP) 5 µg různých OMV adsorbovaných na Al(OH)₃ ve dnech 0, 14 a 28. Vzorky krve byly odebírány ve dnech 28 (14. den po II imunizaci) a 35 (7. den po III imunizaci), a testovací dávky byly podány v den 35 (IP). Testovací dávka byla 20 x LD₅₀ (~10⁷ CFU/myš). Sedm dnů po testovacím podání byla monitorována míra úmrtnosti.

Injekcemi byly podány následující OMV:

Skupina 1: váčky Cps-, PorA+

Skupina 2: váčky Cps-, PorA-

Skupina 3: váčky Cps-, PorA-, NspA+

Skupina 4: váčky Cps-, PorA-, Omp85+

Skupina 5: váčky Cps-, PorA-, Hsf+

Na obr. 15 jsou ukázány analýzy těchto OMV pomocí SDS PAGE (barvení Coomassie).

24 hod po testovacím podání byla pozorována u negativní skupiny 100% úmrtnost (8/8) (imunizace samotným Al(OH)₃), zatímco myši imunizované pěti různými preparáty OMV byly stále na živu (přežilo 7 až 8/8). V průběhu sedmi dnů bylo také monitorováno onemocnění, přičemž se myši imunizované váčky s nadměrnou expresí NSPA jevily jako méně nemocné než myši v jiných skupinách. Je pravděpodobné, že PorA přítomný ve váčkách PorA+ poskytuje velkou míru ochrany proti infekci homologním kmenem. Ochrana indukovaná váčky se zesílenou přítomností PorA- je však pravděpodobně způsobena alespoň do určité míry přítomností zvýšeného množství NspA, Omp85 nebo Hsf.

Příklad 20

Imunogenicitá rekombinantních váčků měřená metodami ELISA s celými buňkami a specifickou ELISA

Pro měření schopnosti protilátek rozpoznávat antigeny přítomné na povrchu buněk MenB byla testována spojená myší séra (příklad 19) metodou ELISA s celými buňkami (s použitím buněk inaktivovaných tetracyklinem), a titry byly vyjádřeny jako střední titry.

Všechny typy protilátek z váčků indukovaly vysoké titry protilátek celých buněk, zatímco negativní kontrolní skupina měla jasné negativní výsledky.

Váčky	WCE (H44/76) střední titr	
	14P2	14P3
CPS(-) PorA(+)	23849	65539
CPS(-) PorA(-)	20130	40150
CPS(-) PorA(-) NSPA(+)	8435	23846
CPS(-) PorA(-) OMP85(+)	4747	16116
CPS(-) PorA(-) HSF(+)	6964	22504
(-)	51	82

Byla sledována specifická protilátková odpověď na dostupný rekombinantní protein HSF. Mikrotitrační destičky byly potaženy úplnou molekulou HSF v množství 1 µg/ml.

Výsledky ukázané na obr. 16 ukazují, že byla získána dobrá odpověď specifická pro HSF, jestliže byly pro imunizaci myší použity OMV se zvýšenou expresí HSF (použitím čištěného rekombinantního HSF na destičkách). Váčky se zvýšenou expresí HSF indukují dobré úrovně specifických protilátek.

SEQ. ID NO: 1

Nukleotidová sekvence vektoru pCMK(+)

TCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGGTCGGTTCGGTTCGGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
AAAAGGCCGCTTGTCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGCAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGG
TGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTCTGTTCCGACCCT
GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCA
GTTCCGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGGTGTGTGCAGCAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGT
AACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAGCACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC
GAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTGTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCAACCGCTGGTAGCGGT
GGTTTTTTTGTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGT
TGACGCTCAGTGAACGAAACTCAGCTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCTTTT
TAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT
GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACG
GGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA
ACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGGTCTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGCGCG
GAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGCACAAGTGTGTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTC
GTCGTTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAG
CGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTGGCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTG
CATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA
GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGC
TCATCATTGGAAACGTTCTTCGGGGCGAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACT
CGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATCTCATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTTATCAGG
GTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAATAAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGA
AAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG
TCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGG
ATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGCGCGTCAGCGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCA
GAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATAAATTGTAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAT
CAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTG
TTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAAGCTGGAAGTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGCTCTATCAGGGC
GATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTGGGGTGGAGTGCGGTAAGCACTAAATCGGAACCTTAA
AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCGAAGCTGGCGAGAAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAGCGG
GCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCAAGCTGCGCGTAACCCACACCCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGC
GCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATGCGGTGTGAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCAT
TCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGG
ATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAAGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAAGC
TTGCCGTCTGAATACATCCCGTCATTCTCTCAAAACAGAAAAACCAAAATCAGAAACCTAAAATCCCGTCATTCCCGCGCA
GGCGGGAATCCAGTCCGTTCAAGTTTCGGTCATTTCGATAAATCTCTGCTGCTTTTCAATTTCTAGATTCCCACTTTCTGTG
GGAATGACGGCGGAAGGGTTTTGGTTTTTCCGATAAATCTGTAGGCATTGAATTTCTAGATTCCCGCTGCGCGGGAA
TGACGGCTGTAGATGCCCGATGGTCTTTATAGCGATTAAACAAAAATCAGGACAAGGCGACGAAGCCGACAGCAGTACAG
ATAGTACGGAACCGATTCACTGGTGTCTCAGCACCTTAGAGAATCGTTCTCTTTGAGCTAAGGCGAGGCAACGCCGTAC
TTGTTTTTGTAAATCACTATAAAGTCCCGGTGTGTTTTTTATGGCGTTTTAAAAAGCCGAGACTGCATCCGGGCAGC
AGCGCATCGGCCCCGACGAGGTCTCTGGAGTCGCGAGCATCAAGGGCGAATCTGCGAGGGGGGGGGGAAAGCCAGGTT
GTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAA
CAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATCAACGGGAACGTTCTGCTCGAGGCGCGGATTAAATTCACATGGATG

CTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCC
GATGCGCCAGAGTTGTTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTG
GCTGACCGAATTTATGCTCTCTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGA
TCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTGAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTC
CTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGTTTGTAAATGTCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCTCGCTCAGGCGCAATC
ACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAG
AAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTGAGTCTGCTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTGAC
GAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCCGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAA
CTGCTCTGGTGAGTTTCTCTTCATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATATGTTATTGATAATCCTGATATGAATAAT
TGCAGTTTCATTGATGCTCGATGAGTTTTCTAATCAGAAATGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTG
ACTTGACGGGACGGCGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCGACAAC
GCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAGGTTCAAAATCACCACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTC
CCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTGAGGCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAGGCGAGCCTCAGC
GCCCCCCCCCTGCGAGGCTGCGCTTGAATTGTGTTGTAGAAACACAACGTTTTTGAATAAATAGCTATTGTTT
TATATCAAAATATAATCATTTTTAAATAAAGGTTGCGGCATTATCAGATATTGTTCTGAAAAATGGTTTTTTCGGG
GGGGGGGTATAATTGAAGAGTATCGGGTGTGTGCGCGAATTGTGAGCGGATAACAATTGATGTTTTTAGGTTTTTA
TCAATTTACAAAAGGAAGCCCATATGCATCCTAGGCCTATTAATATTCCGGAGTATACGTAGCCGGCTAACGTTAACAA
CCGGTACTCTAGAACTATAGCTAGCATGCGCAATTTAAAGCGCTGATATCGATCGCGCGCAGATCTGATTAAATAGGC
GAAAATACCAGCTACGATCAATCATCGCCGCGGTTGATTATGATTTTCCAAACGCATCTCCGCCATCGTGTCTGGCGC
TTGGCTGAAACGAATACCGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCGCGCTCGCTCGGTTTGGCGCCAAATTTCTAA
TATCGGGGCGGTGAAGCGGATAGCTTTGTTTTGACGGCTTCGCTTCATTCTTTGATTGCAATCTGACTGCCAATCTGC
TTCAGCCCCAAACAAAAACCGGATACGGAAGAAAAACGGCAATAAAGACAGCAAAATACCGTCTGAAAGATTTTCAGCG
GTATTTGCGATTTTGGCTTGGTTTGACATATAGTGAGACCTTGGCAAAAATAGTCTGTTAACGAAATTTGACGCATAA
AAATGCGCCAAAAAATTTTCAATTGCCCTAAACCTTCTTAATATTGAGCAAAAAGTAGGAAAAATCAGAAAAATTTTGCA
TTTTGAAAATGAGATTGAGCATAAAATTTTAGTAACCTATGTTATTGCAAAAGGTCGCAATTGTCATTCCACGCGAGGG
GGAATCTAGTCTGTTGCGTTTCAGTTATTTCCGATAAAATCTGCTGCGCGCTGCAAGAATTCGTAATCATGGTCATAG
CTGTTTCTGTTGAAATGTTATCCGCTCACAATTCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGG
TGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGC
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCATTGCGGCGC

SEQ. ID NO: 2

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (997 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu NspA *Neisseria meningitidis* séro skupina A kmen
Z2491

GGAACCGAACACGCCGTTCCGTCATACGCCGCGGAAAGGTTTGGCGCAAGACGAAGCCGCCCTCGACATCGAAGACGCGG
TACACGGCGCGCTGGAAAGCGCGGGTTTTGTCCACTACGAAACATCGGCTTTTGGAAACAGCCATGCAAGTCCCGCCAC
AATTTGAACTACTGGCAGTTCCGGCGATTATTTAGGCATAGGCGCGGGCGCGCACGGCAAAATTTCTATCCCGACCGCAT
CGAGCGCACCGTCCGCGCGCGCCACCCCAACGACTACCTCGCTTAATGCAAAACCGACCGAGCGAAGCCGTCGAACGCA
AAACCGTCCGCGCGGAAGATTGCGGTTGCAATTGATGTAAGCGCCCTGCGCCTGACCGAGCGGCTACCCACCGCGATG
TTGCAGGAGCGCACGGGCGTACCGAGTGCCAAATCATGGCGCAATCGAAACGGCAAGGCAAAAAGGCTGCTGGAAAC
CGACCCCGCGTATTTCCGCGGACCGAAAAAGGACGCTTGTTTTTAAACGATTGCTGCAAGTGTTTTTATAGTGGAATTA
ACAAAAACAGTACGCGGTTGCTCTGCGCTTAGCTCAAAGAGAAGGATTCTCTAAGGTGCTGAAGCACCAAGTGAATCGGT
TCCGTACTATCTGTACTGTCTGCGGCTTCGTGCGCTTGTCTGATTGTTTGTAAATCCACTATATAAGCGCAACAAATCG
GCGCGCGCGCGGAAAAACCCCGGACCGGTCGGAAAAATATGCTTATCGATGGAACCGCAGCGCATCCCCCGCGG
GCGTTTCAGACGGCACAGCCGCGCGGAAATGTCGACGCTTAAGGCACAGCGCACAAAAAACCGGTATGCTGCGAC
CTGCAACAATCCGACAGATACCGCTGTTTTTCCAAACCGTTTGCAAGTTTACCCATCCGCGCGGTGATGCGGCCACCA
CCATTTAAAGGCAACGCGCGGTTAACGGCTTTGCGG

SEQ. ID NO: 3

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu D15/Omp85 *Neisseria meningitidis* séro skupina B
kmen ATCC13090

ACCATTGCCGCCCGCGCGGCTTCCAAAGCGCGGACAAAATACAATCGGTCAACGGCACACCCGTTGCAGATTGGGGCAG
CGCGCAAACCGAAATCGTCCTCAACCTCGAAGCGCGCAAAGTCGCGTGGGTTTCAGACGGCATCAGGCGCGCAAACCGT
CGCACCATCGATGCCCGAGGCACGCGGAAGCGGTAAATCGCAAAAACCAAGGCTACATCGGACTGATGCCCTTTA
AAATCACAACCGTTGCCGGTGGCGTGGAAAAAGGCAGCCCCGCGGAAAAGCAGGCTGAAACCGGGCGACAGGCTGACT
GCGCGCAGCGCAAACCCATTACCTCATGGCAAGAATGGGCAAACCTGACCGCCAAAGCCCGGCAAAAAATCACCTT
GAACTACGAACGCGCGCGACAAACCCATACCGCGGACATCGCGCCCGATCTGTGGAACAGCCCGACCAACCTGATCG
GGCGCGTCCGCTCCGTCCGCGAGCGGACAGGGCGTGGGACGCGCAATCCGCGCGAGCTACCGTCCGTCTGTATCCGC
GCATTCCGCATGGGCTGGGAAAAACCGTTTCCCACTCGTGGACAACCTCAAATTTTCGGCAAACTAATCAGCGGCAA
CGCTCCGTGACCCATATTTCCGGGCGGTGACCATTTGCCGACATTGCCGACAGTCCGCGGAACCTCGGCTTGCAAAGTT
ATTTGGAATTTTGGCACTGGTCAGCATCAGCCTCGCGGTGCTGAACCTGCTGCCGTCCCGTTTGGAGCGGCGGCAC
CTCGTGTTTTACTGCGGAATGGATACGCGGCAAACCTTTGGGCGAACGCGTCCAAAACATCGGTTTTCGCGTTCGGGCT
TGCCCTCATGATGCTGATGATGGCGGTCCGCTTCTTCAACGAGCTTACCGCGTGTCTCGGTTAGATTTTACGTTTCGGAA
TGCGGTCTGAAACCGCATTCCGCACCACAAGGAATGACA

SEQ. ID NO: 4

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu podobnému Hsf *Neisseria meningitidis*

ATCCCCCGCAGGCGGGAATCCAGAAACGCAACGCAACAGGAATTTATCGGAAAAACAGAAACCTCACCGCGTCATT
CCGCAAAAGCGGGAATCTAGAAACACAACGCGCGCAGGACTTTATCAGAAAAACAGAAACCCACCGCGTCATTCCCGC
AAAAGCGGGAATCCAGACCCGTCGGCACGGAACTTACCGGATAAAACAGTTTCCTTAGATTCCACGTCCTAGATTCCCG
CTTTCCGGGAATGACGAGATTTTAGATTATGGGAATTTATCAGGAATGATTGAATCCATAGAAAAACCAAGGAATCTA
TCAGAAAAACAGAAACCCACCGCGTCATTCCCGCGCAGGCGGGAATCCAGAAACACAACGCGCGCAGGACTTTATCGG
AAAAAACCGAAACCCACCGCGTCATTCCCGCAAAAGTTGGAATCCAAAAACGCAACGCAACAGGAATTTATCGGAAA
AAACAGAAACCCACCGCGTCATTCCCGCGCAGGCGGGAATCCAGAAACACAACGCAACAGGAATTTATCGGAAAAAC
AGAAACCCACCGACCGTCATTCCCGCAAAAGCGGGAATCCAGCAACCGAAAAACCAAGGAATCTATCAGCAAAACAG
AAACCCCGACCGTCATTCCCGCGCAGGCGGGAATCCAGAAACACAACGCGCGCAGGACTTTATCGGAAAAACAGAA
ACCCACCGACCGTCATTCCCGCAAAAGCTGGAATCCAAAAACGCAACGCAACAGGAATTTATCGGAAAAACAGAAAC
CCACCGCGTCATTCCCGCAAAAGCGGGAATCCAGACCCGTCGGCACGAACTTACCGGATAAAACAGTTTCTTAGAT
TCCAGCTCCAGATTCCCGCTTCGCGGGAATGACGAGATTTTAAGTTGGGGAATTTATCAGAAAAACCCCAACCCCA
AAAACCGGCGGATGCCGCACCATCCGCCCCCAACCCCGATTAAACATTCAACCAACCAAAAGAAAAACAA

SEQ. ID NO: 5

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (772 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu PilQ *Neisseria meningitidis*

GCGATGTCGGGAAGCCTTCTCCGAATCATTACCCCTTGAGTCGCTGAAATCGCCCAATCTCCGGAAAACGGCGGCAAT
CATGACGGCAAGAGCAGCATCTGAACCTCAGTGCCATTGCCACCACCTACCAAGCAAAATCCGTTAGAAGAGCTTGCCGC
AGAAGCGGCACAAAATGCCGAGCAAAAATACTTACGTTAGGGAACCATGAAACACTATGCCTTACTCATCAGCTTTCT
GGCTCTCTCCGCGTGTTCCTCAAGTTCTGAGGACCTAAACGAATGGATGGCACAAACGCGACGCGAAGCCAAAGCAGAAA
TCATACCTTTCCAGACCTACCTGCGCGTTGCGCGGTATACAGCCCGCGCAGCTTACAGGGCCGAACGCATTTCGAC
TTCCGCCGATGGAACCGACAAAAAGGGGAAATGCCCGGACACCAAGCGTATTAAAGAAACGCTGGAAAAATTTCAG
TTTGAAAAATATGCGTTATGTGCGCATTTTGAAGTCTGGACAGAAAGTCTCCGCTTCATCGAGGCTGAAGGTTATGTCT
ACACTGTGCGGTGTCGGCAACTATTGGGACAAAACCTACGGTAGAATCGAAAGCATTACCGACGACAGCATCGTCTGAAC
GAGCTGATAGAAGCAGCAGGCAACTGGGTTTCCCGTAAAGCAGAACTGCTGTTGAATCTTCCGACAAAAACACCGA
ACAAGCGGCAGCCTGCCGCGAGAACAAAATTAAGAAGAGGATTACTCCATT

SEQ. ID NO: 6

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu Hap *Neisseria meningitidis*

GTGCGGCAAAAAACGCAAAAGCCCGCTGTCGATTGCTGACCGTCCGCGTCCGTAATAATCAGCATAGGTTGCCACGCGC
GGCTTGGGCGTTTTCCACACAAAGCCTCTGCCATCGGCAGCAGGTTTTTCCCGATATGCGTATCACGCCACGCGCGC
GCGCCGCGGTGCGGTAGCGACTGCCGAATCGTTGGAACGTTATCCGACATAAAACCCCGAAAATTCAAAACAGCCGCG
ATTATAGCAATGCGCTCTGAAGTCGACGGTTTGGCTTTAGACGGCATAAAACCCGAAAAATGCTTGATAAATCCGTC
CGCCTGACCTAATATAACCATATGGAACAAACGAAACACATACGCCCTTCTGCTCGGTATAGGCTCGCTGCTGGGTCTGTT
CCATCCCGCAAAAACCGCCATCCGCCCAATCCCGCGGACGATCTCAAAAACATCGCGCGGCGATTTTCAACGCGCCATAG
AGAAAGCGCGAAAATGACCGAAAACGCACAGGACAAGGCGCGGAGGCTGTCGAAACCGTCGTCAAATCCCGGAGCTTG
TCGAGCAATCTGTCCGACGAGTAGTGTCAAATAATGATAGCCCGCGCTTTCCATTCCGGATCGTTGCCGCGCGCGTCC
GACTTGGCGCAATACAACGACATTATCAGCAACGGGGCAGACCGCATTATGGCAATGGCGGAAAAAGAACAGCCGTCGG
GCACGAAACCATACGGCAAGACCAACCTTCAACAGGCGCGGCAACTGTACGGCTTCATCAGCGTCATCTGATACTGC
TTTTTGCCGCTCTTCTCGTATGGAGCGGCTACCCCGCAACCGCGCGCTCCCTTGGCGCGGCGACAGTGGTTGCCCTTGGCG
GGTGCTTTTCGTGATTGGAAGAAGCCGAGACCAAGGCAAAATTAATTGCAATCCTAGGGCGTGTCTCATATCCGCCCGGA
ACGCCGAACCGCACATATAGGCACATCCCGCGCGCGCGCGGAAGCGGAAGCGCGCGCTCCCAACAAACCCGAATCCCG
TCAGATAAGGAAAAATA

SEQ. ID NO: 7

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (924 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu NspA *Neisseria meningitidis* (séroskopina B)
(ATCC13090)

GGAACCGAACACGCGCTTCGGTCATACGCCGCCGAAAGGTTTGGCGCAAGACGAAGCCGCCCTCGACATCGAAGACGCGG
TACACGGCGCGCTGGAAGGCGCGGGTTTTGTCCACTACGAAACATCGGCTTTTGGCAAAACAGCCATGCAGTGCCGCCAC
AATTTGAACTACTGGCAGTTTCGGCGATTATTTAGGCATAGGGCGGGCGCTCACGGCAAAATTCCTATCCCGACCGCAT
CGAGCCGACCGCTCCGCCCGCCGCCAACGACTACCTCGCCTTAATGCAAAAGCCAACCGAGTGAAGCCGTCGAACGCA
AAACCGTTGCCGCGGAAGATTGCGGTTTGAAGTTCATGATGAACGCGCTGCGCCTGACCGACCGGTACCGCGCGCGATGT
TGCAGGAGCGCACGGCGTACCGAGTGCCAAATCATGGCGCAAATCGAAACGGCAAGGCAAAAGGCGCTGCTGGAACCC
GACCCCGCGCTATTCCGCCGACCGAAAGGACGCTTGTTTTAAACGATTGCTGCGAGTGTTTTTATAGTGGATTAA
CAAAACCGAGTACGGCGTTGCTTCGCTTAGCTCAAAGAGAAGCATCTCTAAGTGCTGAAGCACCAAGTGAATCGGTT
CGGTACTATTGTACTGTCTGCGGCTTCGTCGCGCTTGTCTGATTGTTTGTAAATCCACTATATAAGCGCAACAAATCGG
CGGCCGCGCGGAAACCCCGCGGACCGCGTCCGGAATAATGCTTATCGATGGAAACGCGACCGCATCCCGCGCGG
GCGTTTCAGACGGCACAGCCGCGCGGAATGTCCGACGCTTAAGGCACAGACGCACACAAACCGTATGCTGCACCT
GCAACATCCGACAGTACCGTGTTTTTCCAAACCGTTGCA

SEQ. ID NO: 8

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu FrpB *Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

AAGTGGGAATCTAAAAATGAAAAGCAACAGGAATTTATCGGAAATGACCGAAACTGAACGGACTGGATTCCCGCTTTCCG
GGGAATGACGGCGACAGGTTGCTGTTATAGTGGATGAACAAAAACAGTACGTCGTTGCCCTGCGCTTAGCTCAAAGAGA
ACGATTCTCTAAGGTCGTGAAGCACCAGTGAATCGGTTCCGTCCTATTGTAAGTGTGCGGCTTCGTCGCTTGTCCCT
GATTTCTGTTGCTTTTCGGTTTATCCCGATAAATTACCGCGCTTCTCGTCATTCTTTAACCTTCGTCATTCCCGCG
AGGCGGGAATCTAGTTTTTTGAGTTCAGTTGTTCTGATAAATCTTGCAGCTTTGAGTTCCTAGATTCCTACTTTG
TGGGAATGACGGTGGAAAAAGTTGCGGTGATTTCCGATAAATTTTCGTAACGCATAATTTCCGTTTTACCCGATAAATGCC
CGCAATCTCAAAATCCCGTCATTCCCAAAAAACAAAAATCAAAAAACAGAAATATCGTCATTCCCGCGCAGCGCGGAATCT
AGACCTTAGAACACACAGCAATATTCAAAGATTATCTGAAAGTCCGAGATTCTAGATTCCCACTTTGCTGGGAATGACGAA
TTTTAGGTTTCTGTTTTGTTTTCTGTCCTTCCGGGAATGATGAAATTTAAGTTTTAGGAATTTATCGGAAAAACAG
AAACCGCTCCCGCGTCATTCCCGCACAGGCTTCGTCATTCCCGCGCAGGCTTCGTCATTCCCGCATTTGTTAATCCACTA
TATTCGCGCGTTTTTTACATTTCCGACAAAACCTGTCAACAAAAACAACTTCGCAATAAAAAACGATAATCAGCTT
TGCAAAATCCCCCCCCCTGTTAATATAAATAAATAATTAATTAATTTTCTTATCTGCAAAATCTTAACGGT
TTGATTACTTCCCTTCATACACTCAAGAGGACGATTGA

SEQ. ID NO: 9

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu FrpA *Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

CTATAAGATGTAAATAAAATCTCGGTAACGGTAACACTTTGGCTCAGCAAGGCAGCTACACCAAAACAGCGGTACAA
CCGCAAAATGCGGGGATTACTTTTAGCAGCCGACAATCTGCACAGCCGCTTCAGGAACAAATGCTATCCATTAGCCAT
GTTCCGGGAAAACAGGATTCCCGCTTTGTTTTAGGCTGTCTAAACAAATAACATAAATGTATATCATTATTTAAATAA
ATAAAGTATTATACTATTATTGACGAAATTTAGAGAAAGAGTAGACTGTGATTAAATGACAAACAAATAGTGAGAAAG
GAAATATTACTATCCGAGCACAGACATATTTAGGTAGCCTGTAAGTGTTCCTGCTGGCGGAAGAGGATGAAGGTGGA
CTTACCCGAGAAATAATGTCCTGTTGTGTGATATGGATGCCATGCCGGAAGCAATGATGCAATCAGGCGAGTCTTACT
TGAATGAAACCTGTCGTTGCGAGATTGAAAACGCTATTTTAAAGAAAGGATAAAGGGGAGAAAGAAATTTTGGTTTTAA
GCTGCATGAAACCGTGTGGAATAAATGCACACCTACGATAATTAATAATTTTCGTTTTTATTCTACAAGCTATTTATA
TATGATTGCTAAAGGTTATTTTAGATGCCAAAAATATATTTATATACTTCATATTGTTATATGCTTTATTGTA
ATATATCTTACGATGGGGAAATTTATATATTTTATAATAATTTTACTCATTGCTAATATGTCATGGAATATTACTT
GTATTTGTAGAAATTTTCCATATGAAATATTCATTTACTATTTTCTGAACTTTATTAGTTTATTTTAAATTTTT
ACCTCTTATATTTACCATAAGAGAGCTAATTGATTATATATTGAGTCGATAATTAATTTATCTTAATTTAATTC
CTCAGTTATTTTTTAAATTTACTTGAAGGAAAGCAGAT

SEQ. ID NO: 10

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *FrpC Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

GGAAACAGAGAAAAAGTTTCTCTTCTATCTTGGATAAAATATATTTACCCTCAGTTTAGTTAAGTATTGGAATTTATACC
TAAGTAGTAAAGTTAGTAAATTTATTTAACTAAAGAGTTAGTATCTACCATAATATATTTCTTAACTAATTTCTAGGC
TTGAAATTATGAGACCATATGCTACTACCATTTATCAACTTTTATTTTGGTTATTGGGAGTGTCTTACTATGACCTCA
TGTGAACCTGTGAATGAAAGACAGATCAAAAAGCAGTAAGTGCGCAACAGGCTAAAGAACAAACCAAGTTTCAACAATCC
CGAGCCAAATGACAGGATTTGAACATACGGTTACATTGATTTTCAGGGCACCAAAATGGTTATCCCCTATGGCTATCTTG
CACGGTATACGCAAGACAATGCCACAAAATGGCTTTCCGACACGCCCGGGCAGGATGCTTACTCCATTAAATTTGATAGAG
ATTAGCGTCTATTACAAAAAACCGACCAAGGCTGGGTCTTTCAGCCATACACCAGCAAAACAAAGCACACTTTATCCA
ATTTCTACGCGACGGTTTGGATAGCGGTGGACGATATTGTTATCCGAAAAGATGCGTGTAGTTTAAAGTACGACTATGGGAG
AAAGATTGCTTACTTACGGGGTTAAAAAATGCCATCTGCCTATCTCGAATACGAGGCTTATGAAGATAAAGACATATT
CCTGAAAAATCCATATTTTCATGAATTTTACTATATTAAGAAAGGAGAAAAATCCGGCGATTATTACTCATCGGAATAATCG
AATAAACCAAACTGAAGAAAGATAGTTATAGCACTAGCGTAGGTTCTGTATTAACGGTTTACGGGTACAGTATTACCCGT
TTATTCCGGGAAAAGCAGCAGCTCACACAGCAGGAGTTGGTAGGTTATCACCACAGTAGAGCAATTGGTACAGAGTTT
GTAAACAATTCAAATAAAAAATAATTTAAAGGATCTTAT

SEQ. ID NO : 11

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *Omp85 Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

ACGTCGAACCGTGATTCGCGCAACGCGCGGCCAAAACCAAAGCCCAAGCCAAATGCCGATATAGTTGGCATTGGCAAT
CGCGTTAATCGGGTTGGCGACCGAGTTTCATCAGCAGCGATTTCACACTTCCACAATGCCGAAGGCGCGCGCGGACA
CATCGCCCGCGCCCGCCAAAACAAATGTGCGTGGGAAAACCATACCGCGGATGACGGCGGTGAGGGCTGCGGAAAACGTA
CCAATGAGGTAAAGGATGATAATCGGCGTGATATGCGCCTTTTGGTGTGCGCGATTGTGGCGCGCCACCAA
AATAAATACCAAAACCGCGCGACCGCTTTGAGCGCGCGCACAAACAGGCTGCCGAACAAGCCTGCCGCCAAGCCAGTT
GCGGGGAAACCGAACCAGTACGATGCCCAACGCGCAACCGCGCGCAATCTGCCTGACCGAGGCTGACGCGCGCGATCGCA
TGAAATAAGGATTTGCCGAACGCCATAATCTTCTTATGTTGTATGTTTAAAAATGTTGTATTTTAAAGAAAACT
CATCTCTGTGTTTCTTTTCTTTCGGCTGTGTTTAAAGGTTGCGTTGATTTCGCCATGACGTGCCGACAGGCTTTG
CTTTATCATTGCGCGCAACGGTTAATTTATGAACGAAAATAAATTTAATCTCTGCTATTTTCCGGCACTTTCC
GAAACGCGAGCTGTTTCCATATGCGGATTGGAAACAAAATACCTTAAACAAGCAGATACATTCCGGCGGGCGCTCAAC
CTCCGAAATACCGGCGCGGATGCGGTCTGAAGTGTCCCGCCCGTCCGAAACACACAAAAACAGCCGTTCCGAACCCCT
GTCCGAACAGTGTAGAAATCTGCCACACCGATGCACGACACCCGTACCATGATGATCAAACCGACCGCCCTGCT
CCTGCCGCTTTATTTCTTTCCGACGCATACGCGCT

SEQ. ID NO: 12

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (772 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *PilQ Neisseria meningitidis* (séroskopina B)
(ATCC13090)

GCGATGTCGGGAAGCCTTCTCCGAATCATTACCCTTGAGTCGCTGAAAATCGCCCAATCTCCGGAAAACGGCGGCAAT
CATGACGGCAAGAGCAGCATCTGAACCTCAGTGCCATTGCCACCACTACCAAGCAAAATCCGTAGAAGCTTGCCTG
AGAAGCGGCAAAAATGCCGACAAAATAACTTACGTTAGGGAACCATGAAACACTATGCCCTACTCATCAGCTTTCT
GGCTCTCTCCGCGTGTTCGAAGGTTCTGAGGACCTAAACGAATGGATGGCACAACCGGACGCGGAAGCCAAAGCAGAAA
TCATACCTTTCCAGACCACTACCTGCGCGTTGCGCGGTATACAGCCCGCGCAGCTTACAGGGCCGAACGCATTCCAG
TTCCGCGGATATGCGTTATGTCGGCATTTTGAAGTCTGGACGAAAGTCTCCGCTTTCATCGAGGCTGAAGTTATGTCT
ACACTGTGCGGTGTGCGCACTATTTGGGACAAAATACGGTAGAATCGAAAGCATTACCGACGACAGCATCTGCTGAAC
GAGCTGATAGAAGACAGCAGGCAACTGGGTTTCCCGTAAAGCAGAAGTCTGTTGAATCTTCCGACAAAACACCGGA
ACAAGCGGACGACCTGCCGACAGCAAAATTAAGAAGAGGATTACTCCATT

SEQ. ID NO: 13

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu podobnému *Hsf Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

TTTGTCTTTCTTTTGGTTTGTGTAATGGTTAAATCGGGGTTTGGGGCGGATGGTGCGGCATCCGCCCGGTTTTTGGG
GGTTGGGGGTTTTCTGATAAATCCCCCAACTTAAATCTCGTCATTCCCGCGAAGGCGGGAATCTGGGACGTGGAATCT
AAGGAAACTGTTTTATCCGGTAAGTTTCCGTGCCGACGGGTCTGGATTCCCGCTTTTCCGGGAATGACGGCGGTGGGGTT
TCTGTTTTTCCGATAAATCTGTTGCGTTGCGTTTTTGGATTCCAGCTTTTCCGGGAATGACGGTCGGTGGGGTTTTCT
GTTTTTCCGATAAAGTCTGCGCGTTGTGTTTTCTGGAATCCCGCTTCCGCGGAATGACGGTCGGTGGGGTTTTCTGT
TTTTGCTGATAGATTCTGTGGTTTTTCCGGTTGCTGGATTCCCGCTTTTCCGGGAATGACGGTCGGTGGGGTTTTCTGTT
TTTCCGATAAATCTGTTGCGTTGTGTTTTCTGGAATCCCGCTTCCGCGGAATGACGGTCGGTGGGGTTTTCTGTTTTTCCGA
CGATAAATCTGTTGCGTTGCGTTTTTGGATTCCAATCTTTCGGAATGACGGTCGGTGGGGTTTTCTGTTTTTCTGATAGA
TTCTGTGGTTTTTCTATGATTCAATCATTCTGATAAATCCCATAACTTAAATCTCGTATTCCCGCGAAGCGGG
AATCTAGGACGTGGAATCTAAGGAACTGTTTTATCCGGTAAGTTTCCGTGCCGACGGGTCTGGATTCCCGCTTTTCCGG
GAATGACGGCGGTGGGGTTTTCTGTTTTTCTGATAAAGTCTGCGCGTTGTGTTCTAGATTCCCGCTTTTCCGGGAAT
GACGGCGGTGAGGTTTTCTGTTTTTCCGATAAATCTGTT

SEQ. ID NO: 14

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *Hap Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

AATCAGCATAGGTTGCCACGCGCGGCTTGGGCGTTTTCCACACAAAGCCTCTGCCATCGGCAGCAGGTTTTTCCCGGAT
 ATGCGTATCAGCGCCACGCGCGCGCGCGGTTGCGGTAGCGACTGCCGCAATCGTTGGAACGTTATCCGCACATAAAACC
 CCGGAAAATTCAAACACGCGCGCGGATTATAGCAAATGCCGTCTGAAGTCCGACGGTTTGGCTTTCAGACGGGATAAACCCG
 CAAAATGCTTGATAAATCCGTCCGCTGACCTAATATAACCATATGGAACAAACGAAACACATACGCCCTTCTGCTCGGT
 ATAGGCTCGCTGCTGGGTCTGTTCATCCCGCAAAACCGCCATCCGCCCAATCCCGCCGACGATCTCAAAAACATCGG
 CGGCGATTTCACACGCGCCATAGAGAAAGCGCGAAATGACCGAAACGCAAGGACAGGCGCGCGGCGGCTGTCCGAAAC
 CGTCGTCAAAATCCCGGAGCTTGTGAGCAAACTCTGTCCGACGAGTACGTGCAAAATATGATAGCCCGCGGTTTCCATT
 CGGGATCGTTGCCGCGCGCGTCCGACTTGGCGCAATACAACGACATTATCAGCAACGGGGCAGACCGCATTATGGCAATG
 GCGGAAAAGAACAAGCGCTCCGGCACGAAACCATACGGCAAGACCAACCTTCAACAGGCGCGGCAACTGTACGGCTT
 CATCAGCGTCACTCTGATACTGCTTTTGGCGTCTTCTCGTATGGAGCGGCTACCCGCAACCGCGCTCCCTTGGCG
 GCGGCACAGTGGTTGCTTGGCGGGTCTTTCGTGATTGGAAGAAGCGGAGACCAAGGCAAAATTAATTGCAAAATCCTA
 GGGCGTGCTTATATCCGCCGCAACCGCAACCGCACATATAGGCACATCCCGCGCGCGCGGGAAGCGGAAGCGCGCGC
 CTCCCAACAAACCCGATCCCGTCAGATAAGGAAAAATA

SEQ. ID NO: 15

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu LbpA *Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

GATTTTGGTTCATCCCGACAAGCTTCTTGTGCAAGGGCGTGAAATTCCTTTGGTTAGCAAGAGAAAACCATCAAGCTTGC
 CGATGGCAGGGAATGACCGTCCGTGCTTGTTCGCACTTTTGGACCTATGTGAACTCGGACGGATAAACACCGCAAGCC
 CGGCAAGTAAACCAAAGGCGGAAGATAAAAGGGAGGATGAAGAGAGTGCAGGCGTTGTAACGTGGAAGAAGGCGAAGGC
 GAAGTTTCCGAAGATGAAGGCGGAAGAGCCGGAAGAAATCGTGAAGAAGAACCAGGAAGAAGCTGAAGAGGAAGAAGC
 TGAACCCAAAGAAGTTGAAGAAACCGAAGAAATCCGCCACAGAAAGCGGCGGCTTCAACGCCATCTTGCCTG
 CCTCGGAAGCCCTCAAAGGCGAGGACATCGACCTTTTCTGAAAGGTATCCGACGGCGGAAGCCGACATTTCGAAGAACC
 GGAAGACACACTATACCGGCACTTGGGAAGCGGCTATCGGCACACCCATTCAATGGGACATCAGGCGGATAAGAAGC
 GGCATAAAGCAGAAATTTACCGTTAAATTTCCGGCAGAAATCGATTTCGGGAACGCTGACGAGAAAACCGGTGTACAACTG
 CTTTCTAATTGAAATGAGGCAAGATTGAGGGCAACGGTTTCCACGCAACAGCACGCACTCGTGAGAACCGCATCAATCTT
 TCGGGAATGTTTCGACCAACCCAGAACCTTCCAAGCTAGTGATCTTCTGTAGAAGGAGGATTTTACGGCCCGCAGCG
 GAGGAATTTGGCGGTTATTTTCAATAAGGATGGGAAATCTCTTGGTATAACTGAAGGTACTGAAATTAAGTTGAAGT
 TGAAGCTGAAGTTGAAGTTGAAGCTGAAACTGGTGTTCGAACAGTTAGAACCTGATGAAGTTAAACCCCAATTTCGGCG
 TGGTATTCTGGTCCGAAGAAAGATAATAAGAGGTGAAAA

SEQ. IDNO: 16

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu LbpB *Neisseria meningitidis* (séroskopina A)

CGGCGTTAGAGTTTACGGCAGTAAGGGCGCGTCCGCCCTTAGATCTGTAAGTTACGATTCGGTTAAATAACTTTTACTGA
 CTTTGAGTTTTTTGACCTAAGGGTGAAAGCACCTTACTGCTTAAAGTCCACGACAAAAACCAAAGACAAAAACACTT
 TTATTACCTTAAATCGAACACCCATAAATGACCTTTTTTGTCTTTGGCGAGGCGGCTAGTAAGGGCGGCTCCGCCCTTAG
 ATCTGTAAGTTATGATTCCGTTAAATAGCCTTTACTGACTTTGAGTTTTTGGCTAAGGGCGGACGCGCCCTTACTGCT
 TCACCTCAATGGGCTTTGAGTTTGTTCGCTTTGGCTTGTTCGCTAAGGGTGAAAGCACCTTACTGCGGCTCGCC
 AAAGACGAAAAGGGTTATTTACGGGGTTGGATTTTAGGCAGTAAGGGCGCGTCCGCCCTTAGATCTGTAAGTTATGATT
 CCGTTAAATAGCCTTTACTGACTTTGAGTTTTTGGCTAAGGGTGAAAGCACCTTACTGCTTCACTTCAATGGGCTT
 TGAATTTTGTTCGCTTTGGCTTGGCTTGTGATCTAAGGGTGAAAGCACCTTACTGCGGCTCGCCGAAAGACAAACGAGGGCTA
 TTTACGGCGTTAGAGTTTACGGCAGTAAGGGCGCGTCCGCCCTTAGATCCAGACAGTCAGGCTTTGAATAGTCCATTTT
 GCCAAAGAACTCTAAAACGAGGACCTAAGGGTGAAAGCACCTTACTGCTTACATCCAAGCACCTTACTGACACAGC
 TCCACGCACCTTACTGCGCTTACTGCCAGCACCTTACTGCCCTACATCCAAGCACCTTACTGCTTACATAGACATG
 ACAGACGCCGAGCGGGAACAGGACTAAAAACAATTAAGTGATTTTTTGGCCAACTATAATAGCATGTATAATTATA
 TTACTATTAATAATAATTAGTTTATCCTCCTTTTCATCCC

SEQ. ID NO: 17

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (731 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu TbpA *Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

(ATCC13090)

TATGAAGTCGAAGTCTGCTGTTCCACCTTCAATTATCTGAATTACGGAATGTTGACGCGC
 AAAACAGCAAGTCCCGGATGCAGGCAGGAGAAAGCAGTAGTCAAGCTGATGCTAAACG
 GAACAAGTTGGACAAAGTATGTTCTTCAAGGCGAGCGACCGATGAAAGAGAGATTCCA
 AACGACCAAAACGTCGTTTATCGGGGGTCTTGGTACGGGCATATTGCCAACGGCAAGC
 TGGAGCGGCAATGCTTCCGATAAAGAGGGCGGCAACAGGGCGGACTTTACTGTGAATTC
 GGTACGAAAAAATTAACGGCACGTTAACCGGTGACAAACAGGCAGGCGGCAACCTTACC
 ATTGTGGGCGATATTGAGGGCAACGGTTTTTCCGGTACGGCGAAAACCTGCTGACTCAGGT
 TTTGATCTCGATCAAAGCAATAACACCCGACGCCTAAGGCATATATCACAACGCCAAG
 GTGACAGGGCGGTTTTTACGGGGCCAAAGCCGAAGAGTTGGGCGGATGGTTTGCTATTCCG
 GACGATAAACCAACGAAATGCAACAGATGCATCCGGCAATGGAAATTCAGCAAGCAAT
 GCAACTGTCGATTTCGTCGGAACGCCAAAGCCTGTGCAATAGCAGGTTGCGGAAC
 AATCAAGAATAAGGCCTCAGACGGCACCGCTCTTCCGATACCGTCTGAAAGCGAAGAGT
 AGGGAACACT

SEQ. ID NO: 18

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (373 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu Omp1A *Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

(ATCC13090)

CGTACCGCATTCGCACTGCAAGTAAAAAGTATTGAAAGCAGTCGAAGCAGGCGATAAGCTGCCGCACAAGCGGTTTA
 CCAAGAGTCCGTCAAAGTCACTGACCGCATCGCCGACAGGGCGTGTTCATAAAAAACAAGCGGCTCGCCACAAAACCC
 GTTTGTCTCAAAAGTAAACCTTGGCTTGATTTTGCAAAACCTGCAATCCGTTTTCATCGTCGATTCCGAAAACCC
 TGAAGCCCGACGGTTTCGGGTTTTCTGTATTGCGGGGACAAAATCCCGAATGCGGAAGGGTCCGGTTTTTATCCG
 AATCCGCTATAAAATCCGCTGTAACCAATATGCCGACAAATGGGGTGGAG

SEQ. ID NO: 19

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *Pla1 Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

```
TTTTGGCTTCAGCGTTTCATTGTTTTTCGTACAAGTCGTAAGTCAGCTTCAGATTGTTGG
CTTTTTTAAAGTCCTTCGACCGTACTCTCATCAACATAGTTCGACCGAGTGTAGATGTTCA
GAGTATCGGTGGCAGCGGCTTCGGCATTGGCAGCAGACGCGCTCTGCTTGAGGTTGCA
CGGCGTTTTTTTCGCTGCCGCCGAGGCTGCCAGAGACAGCGCGCCAAAACGGCTAATA
CGGATTTTTTCATACGGGCAGATTCTCTGATGAAAGAGGTTGGAAAAAAGAAATCCCCGC
GCCCCATCGTTACCCCGCGCAAGGTTTGGGCAATGTAAAGTAAATTGTGCAAACTCAA
AGCGATATTGGAGTGAATTTCTTAAAAAATTATCTGTTTCCAAAAGGGGAGAAAAACGT
CCGCCCGATTTTGCGGTTTTTTTTCGCTGTCTAGGGTGTCCGACGGCGGATAGAGAGAAA
AGGCTTGCAATAATGTAAACCCCTTTAAAAATTGCGCGTTTACAGAAATTTATTTTCTT
CCAGGAGATTCCAATATGGCAAACAGCGCACAGCAGCAACGTCGCCCGCCAGTCCGTC
AAACAACGCGCCCAATGTCTAGCCTGCGTACCGCAATTCGCAACCGCAGTGAAAAAGTA
TTGAAAGCAGTCGAAGCAGGCGATAAAGCTGCCGACAAAGCGGTTTACCAAGAGTCCGTC
AAAGTCATCGACCGCATCGCCGACAAGGGCGTGTTCACAAAAACAAAGCGGCACGCCAC
AAAAGCCGTCTGCTGCAAAAGTAAAGCCTTGGCTTGATTTTTGCAAAACCGCCAAAGG
GGTTGATACGCGATAAGCGGAAACCCCTGAAGCCGACGGTTTCGGGGTTTTCTGTATTG
CGGGGGCAAAATCCCGAAATGGCGGAAAGGGTGCATTTTTTATCCGAATCCGCTATAAA
ATGCCGTTTGAACCAATATGCCGACAATGGGGCGGAG
```

SEQ. ID NO: 20

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *FhaB Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

```
TACGGAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCCGGTGCCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATC
ACAATGGACATCGTTACCAACGAAGCAACCGAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAACAAATATCAGAGCAGC
CTGGCCGCCGAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACACGCCAAACCTA
TAAATACATCGACGATGCCGAATCGAAGTGCAACGCGCGCGCTCTGAGGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTT
ACCTCAACCTTGGCAGCTTGACGGCAAGTTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCAAGTATGCCTGCACCGGAA
GAAAACGGCGCGATATTCTCCAGGTACATCTCGTATGAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCGAGCGCCCATTTAT
TTTTAGGCAACAGCAGTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATTGGAACAAAACGCCGTTGGTTGCCCAAGATAAAT
TGTCATCGCGCAGCGCTACACCGTTGCGGGATTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAG
AATACCTTTAAGTTGGTATTCTTACCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATTGGCGAAAGTGC
ACAAATATGATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAAGTGGTGGCTTCAGAGGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTT
ATGATCTGTTTGGCGCAAGCGCTTCATAAACCCAAAGGCTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAAT
TACAGTTTCTAACCTCTGAATTTTTTACTGATATTTAGACGGTCTTTCTTATCCTCAGACCGTCAAACTTTTACCTAGCT
ACTTGGCGCGCAGTACGTTTCATCTTCAAAATGGAATAGAC
```

SEQ. ID NO: 21

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *Lipo02 Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

```
TTATCTTGGTGCAAACTTTGTGGGGTTCGGACTGGCTACGGCTTTGGGTTTGGACCGCTCATCGGTCTGATTACCGGT
TCGGTGTGCTGACGGGGGACACGGTACGTAGGTGCGTGGGGACCTAATTTTGAACGCAATACGGCTTGGTTCGGCGC
AACCGGTTTGGGTATTGCTACGGCTACTTTTCGGGCTGGTGTTCGGCGGCGCTGATCGGCGGGCGCGTTGCGCGCCGCTGA
TCAACAAAATGGGCGCAACCGGTTGAAACAAAACAGGATCAGGACGACAAACGCGGACGAGTCTTCGAGCAGGCA
AAACGACCCGCGCTGATTACCGGGAATCTGCCGTTGAAACGCTTGCCATGTTTGGCGCGTGTTCGGCGTTCGGCAGAT
TATGGACGGCTTCGACAAAGAATATCTGTTTCGACCTGCCCAAATTCGTGTGGTGTCTGTTTGGCGCGGCTGGTCAATCCGCA
ACATCTCTACTGCCGCATTCAAGGTCAATATGTTTCGACCGCGCCATCGATGTGTTGGCAATGCTTCGCTTTTCGCTTTTC
TTGGCAATGGCGTTTGGGAATTTGAAACTGTGGGAGCTGACCGGTTTGGCGGGGCGCTGAACCGTGATTCTTGGCGTACA
AACCGTGGTGATGGTTTTGTACGCGACTTTTGTACCTATGCTTTATGGGGCGGCACTATGATCGGCGAGTATTGGCTG
CCGGCCATTGCGGTTTTCGGCTTGGGTGCAACGCCGACGGCGGTGGCAAAATATGAGTCCGTCACGCATCTTTTCGGCGCG
TCGCATAAGGCGTTTTTGTATTGCGCTATGGTTCGGCGCGTTCTTCGTGATTTGATTAAATGCGCGGATTTTCACCGGTTT
TGTGAATTTCTTAAAGGCTGATTTTCGCCCTTTCGACAAAGCACTGCAAGGTTTACCGCTGCAGGTGCTTTTGCTA
TGATAGCGGCTATCGGTCTGCACCGTTTGGAGGAACATC
```

SEQ. ID NO: 22

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *Tbp2 Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

```
CCTACTCCACCGATTCCAATATGCTCGGCGGACCCACGAAGCCAAAGACTTGGAAATTTTGAAGTCCGGGATCAAAATC
GTCAAACCCATTATGGGCGTTGCCTTTTGGGACGAAAACGTTGAAGTCAGCCCGGAAGAAGTCAGCGTGCCTTTGAAGA
AGGCGTGCCGGTTGCATGAACGGCAAGAATACGCCGACCCCGTCGAATCTTCTCGAAGCCAAACCGCATCGGCGGGCC
GCCACGGCTTGGGTATGAGCGACCAAAATCGAAAACCGCATCATCGAAGCCAAATCGCGCGCATCTACGAAGCCCCGGGT
ATGGCGTTGTTCCATCTGCGCTACGAACGCTTGGTGACCGGCAATCCACAACGAAGACACCATCGAACAAATACCGCATCA
CGGCGTTCGCGCTCGGCGGTTTTGCTCTACCAAGGCGCGTGGTTCGACAGCCAAAGCCTTGATGTTGCGCGAAACCGCCCAAC
GCTGGGTTCGCAAAAGCGTTACCGCGGAAGTTACCTCGAAGTTCGGCGCGGCAACGACTACTCGATTCTGAACACCGAA
TCGCCCAACCTGACCTACCAACCGGAACGCTGAGTATGGAAGTTCGAAGGTGCGGCGTTTACCCGCTCGACCGCAT
CGGCAGCTCAGATCGGCAACCTCGACATCACCGACACCCCGCCAAACTGGGCATCTACTCGCAAAGCGGTTTGGTGT
CGCTGGGCGAAGGCTCGGTATTACCGAGTTGGGCAATAAGAAATAAGGTTTGTGTTTTCATCTATTAGCAACTTAAAG
GGTCTGCTGAAAGATGATCCCTTATGTTAAAGGAATCTATGAAAGAAATACAAAGTCGTCATTATCAGGAAAGCCAG
TTGTCAGAGCTGTTTTTCGGCGCGGCAAGGTCAACCCCGTCAATTCAGCGCGTTCTTCAACAAACAAACCCCGAAG
GCTGGCGGGTTCGAGCCTTTGCAATAACATAGGTTACTAA
```

SEQ. ID NO: 23

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *PorA Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

GAATGACAATT CATAAGTTTCCCGAAATCCAAACATAACCGAAACCTGACAATAACCGTAGCAACTGAACCGTCATTCCCG
 GCAAAAGCGGGAATCCAGTCCGTTCCAGTTTCGGTCATTTCGGATAAATGCCTGTTGCTTTTCATTCTAGATTCCCACTT
 TCGTGGGAATGACGGCGGAAGGTTTTGGTTTTTCCGATAAATCTTGAGGCATTGAAATCCAAATTCCTCGCCTGCGC
 GGGAAATGACGGCTGCAGATGCCGACGGTCTTATAGTGGATTAAACAAAATCAGGACAAGGCGACGAGCTGCAGACAGT
 ACAGATAGTACGGAACCGATTCACTTAGTGCTTCAGTATCTTAGAGAATCGTTCTCTTTGAGCTAAGGCGAGGCAACGTC
 GTACTGGTTTTTGTTCCTCACTATATATGACACGGAAAACGCCGCGTCCAAACCATGCCGTCTGAGAAAACCTACACA
 GATACCGCGCTTATATTACAATCGCCGCCCGTGGTTGCAAAAACCTCCACACTAAAAAACTAAGGAAACCTATGTCC
 CGCAACAACGAAGAGCTGCAAGGTATCTCGCTTTTGGGTAATCAAAAACCCCAATATCCGGCGCAATACGCGCGCGAAAT
 TTTGGAAGCGTTCGACAACAACATCCCGACAACGACTATTCGTCAAATTCGTCTGCCAGAGTTCCACGAGCTCTGCC
 CCATGACCGGGCAGCCGACTTCGCCACCATCGTCATCCGCTACATTCCGCACATCAAAATGGTGGAAAGCAAATCCCTG
 AAATCTACTCTCTTCAGTTCCGACTCCGACCCAGCGGATTTTCATGAAGACTGCGTCAACATCATCATGAAAGACCTCATGTG
 CCTGATGGATCCGAAATACATCGAAGTATTCGGCGAGTTTCACACCGCGCGGCGCATCGCCATTCTCTTTCCGCAATT
 ACGGCRAAGCAGGCACCGAGTTTGAAGCATTGGCGCGTAA

SEQ. ID NO: 24

Promotorová oblast *PorA Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

GATATCGAGGCTCGCGCTTGAATTGTGTTGTAGAAACACAACGTTTTTGAAAAATAAGCTATTGTTTTATATCAAAATA
 TAATCATTTTTTAAATAAAGGTTGCGGCATTTATCAGATATTTGTTCTGAAAAATGGTTTTTTGCGGGGGGGGGGTATA
 ATTGAAGACGTATCGGGTGTTCGCCGATGTTTTTAGGTTTTATCAAATTTACAAAAGGAAGCCCAT

SEQ. ID NO: 25

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *PorB Neisseria meningitidis* (séroskopina A)

gttttctgtttttgaggggaatgacgggatgtaggttcgtaagaatgacgggataggtttccgtgaggatggattccgtc
 attcccgccgagcgagggaatctagaacgtggaaatcttaagaaacggttttatccgataaagtttccgtgaggacaagtttgg
 attcccgccgtgagcgagggaatgacgggatgttaggtttcttaattttgggttttctgtttttgaggggaatgacgggatgttagg
 ttctgtaggaatgacgggataggtttccgtgaggatggattccgtcattcccgccgagcgagggaatctagacccttagaac
 aacagcaatattcaagattattctgaaagtccgagattctagattcccgccgtgagcgagggaatgacgaaagtggcgaggaa
 tgacgggttagcgtttgctcgtccttagctcaaaagagaacgattctcctaaggtgctgaagcaccagtgaaatcggttccgta
 ctatttgaactgtctgagcgttctgctgcttgcctgatttttggtaataccactatctcctgcccagggcgagggttttg
 catccgcccgttccgaaagaaacggcggtgctgcttttttgcggtctttataacccccgggtttgcaatgcccctcccaatacc
 ctcgcgagtgaaagtgtgtaaaaatgcaaaatcttaaaaaatattaaataaccatattgttataaaacaaaaataccataaat
 atctctatccgtccttcaaaatgcacatcgaatttccacacaaaaacagggcagaagtttgttttttcagacaggaacatct
 atagtttcagacatgtaatcgccgagccctcgggcggttaaagtgcagaagctaaagcggttggaagcccgccgtgcttaaa
 tttcttaaccaaaaaaggaatacagcaatgaaaaaatccctgattgcctgaactttggcagcccttccgttgcagcaat
 ggctgacgttaccctgtacggcaccatcaaaacggcgta

SEQ. ID NO: 26

Promotorová oblast *PorB Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

GTTTTCTGTTTTGAGGGGAATGACGGGATGTAGGTTCTGAAGAATGACGGGATATAGGTTTCCGTGCGGATGGATTCTGTC
 ATTCCCGCGCAGGCGGGGAATCTAGAAGCTGGAATCTAAGAAACCGTTTTATCCGATAAGTTTTCCGTGCGGACAAGTTTG
 GATTCCCGCCTGCGCGGGAATGACGGGATTTAGGTTCTTAATTTTGGTTTCTGTTTTGAGGGGAATGACGGGATGTAGG
 GTTCGTAGGAATGACGGGATATAGGTTTCCGTGCGGATGGATTCTGTCATTCCCGCGCAGGCGGGGAATCCAGACCTTAGAA
 CAACAGCAATATTCAAAGATTATCTGAAAGTCCGAGATTCTAGATTCCCGCCTGAGCGGGGAATGACGAAAAGTGGCGGGA
 ATGACGGTTAGCGTTGCCCTCGCCTTAGCTCAAAGAGAACGATTCTCTAAGGTGCTGAAGCACTAAGTGAATCGGTTCCGT
 ACTATTTGTAAGTGTCTGCGCCTTGTCTGCTGATTTTGTAAATCCACTAT

SEQ. ID NO : 27

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *siaABC Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

ATACGGCCAATGGCTTCAGAAAGCGATAAGCCTCTGGCTGAAAAACCGATTCTTGTGTTCTCCCCACCGCACCCATAGA
 CGTAAAGGTATAGGGATTGGTAATCATGGTAACCACATACCCGCGACGCAAGCAAAATATTTGTCGCGGATTGTGAACCTA
 AATCTTCCAAGGCAACAGTTGCTACTACATTGCCAGGTGTGAGCTGCACATTCTGATCTGCACATTGTCCGTTGAACCA
 CCTACCGCAGCAGCCGATCCAACACACGCTCACCGGCTGCGGTCAGCGGCATACGCACTATTCCGAGCAGCAATCAC
 CGACACATTCCGCCATTATTCTGCACCAACGCAACCATCACTTGTGGCTGATTGGCCATTTTTTTCAGGCGGCCCTTAA
 TAAATTCCTGAACCTGACAGGCGTTTTACCGACCAACCGAAATATCGCCAACAAACGGCACAGAAACCGTACCACGTCGCC
 GTGACCAACTGCTCTGGCACTTAGTTTGTATGCGCACTACCCGAGCCCATCGAAGAAAGGCCACCAACCAATACTGC
 CGCGCGCGCTTCCCAATCATAATATCCAATACATCAACATATTTAGCGTACCAGCCGAGCATAACCATCGCCAAACT
 GAGTGAATGACTGATTATCTGAGCCTTATATAAATCTGAGCAACCGTATGATTCACTCAATCAGCTCCACATTCAGGA
 ATTTGAATCTCAGATTGTTGCCCTAAGAGACAATTTTTTGGGCTGGGCGCTGATGAAGGAATCGCAGAGCATCCTAC
 AATTAACTTCCACACAATAATAATCTGCTGACGAATATAAATTTCACTTTAAACACAAGCCAATCCTAATATAAT
 TATAAATGGCCTAATTATAGCACTTAATCGAATAAATTTATGAGTACGTAGAGTATAATTAGTATTCTTCTTTCCAAT
 TCCTTATACTTATATATATACTTATAGATTCTAAATC

SEQ. ID NO: 28

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *Igt Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

GCCAAAGCATTGGGCGCGGATGCCGCCGCTGCCGAACGCCGCCGCTCTTGCCAAAGCCGACTTGGTAACCGAAATGGT
CGGCGAGTTCCCGGAAGTCAAGGCACGATGGGCAAAATCTATGCCTGTTTGGACGGCGAAACCGAAGAAATGGCGAAG
CCGTCGAGCAGCAGTATCAGCCCGCTTTTGGCGGACAGCTGCCGAAAGCAAAATGGCGCCGCCGCTGGCCACTGGCC
GACAAACTAGAAACCTTGGTTCGGCATTTGGGGCATTCGGTCTGATTCCGACCGCGCAAAAGACCCCTACGCCCTGCGCGG
CGCTGCCTTGGGTATTTTGGTATGCTGATGACGATGTTGGTGGACGTGAACGAAGTATTGACAGCGGCATTTCGACAGCT
TCCCGAAAGGTTTGTCTCAACGAAAAACGCCGTCTGAACCCGCCGACTTATGCAGGCGCGCTTCCCGTGTGCTGCAA
AACGATTATCCGCAAGACATCGTTGCCGCCGCTACTGCCCAACAGCCGCCGCTTGGACGATTGACCGCCAACTGCA
GGCCGTTGCCGCTTCAACAACTGCCGGAAGCCGCCGCTGCCGCCGCCAACCAACGCGTGCACAAACCTGCTGAAAA
AAGCCGATGCCGAGTTGGGCGCGGTTAACGAAAGCCTGTTGCAACAGGACGAAGAAAAAGCCCTCTTGGCCGCCGCA
GGCTTGCAGCCGAAATCGCCGCCGCCGCTGCCGAAGGCAATTTCCAAACCGCTTGTCCGAAGTGGCTTCGCTCAAAAC
GCAAGTCGATGCATCTTTGACGCGGTGATGTAATGGCGGAAGATGCCGCCGTAACCAAAACCGCTGACACCTGCTGA
ACCGCTTGGCAGAGCAATGAACGCCGTAGCCGACATCGCGCTTTGGGCGAGTAACCGTTGTACAGTCCAAATGCCGTC
TGAAGCCTTCAGACGCCATCGTGCCTATCGGAGAAATAA

SEQ. ID NO: 29

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu TbpB *Neisseria meningitidis* (kmen MC58)

GAACGAACCGGATTCCCACTTTCGTTGGGAATGACGAATTCAGGTTACTGTTTTTGGTTTTCTGTTTTGTGAAAAATAAT
GGGATTTACGCTTGTGGGTATTTACCGGAAAAACAGAAACCGCTCCGCCGTCATTCCCGCGCAGCGGGGAATCTAGGTC
TGTCGGTGGCGAACTTATCGGATAAAACGGTTTCTTGAGATTTTCTGCTCGGATTCCCACTTTCTGTTGGGAATGACGCG
AACAGAAACCGCTCCGCCGTCATTCCCGCGCAGCGGGGAATCTAGACATTCAATGCTAAGGCAATTTATCGGGAATGACGCG
GAACTCAAAAACTGATTCCCACTTTCGTTGGGAATGACGTTGGTGGCAGGTTTCCGTATGGATGGATTCTGCTATCCCGC
GCAGCGGGGAATCTAGACCTTCAATACTAAGGCAATTTATCGGAAATGACTGAACTCGAAAACTGGATTCCCACTTTT
GTGGGAATGACGCGGATTAGATTTCAAAAATTTATCTAAATAGCTGAACTCAACACACTGGATTCCCGCTGCGCGGGA
ATGACGAAGTGAAGTTACCGGAACTTAAACAGCGAAGCGAAACCGAAGCAACTGGATTCCCACTTTCTGTTGGGAATGACGGA
ATGTAGGTTCTGTTGGGAATGACGCGGAGCGGTTTCTGCTTTTCCAATAATGACCCCACTTAAATCCCGTCATTCCCG
CGCGAGCGGGGAATCTAGGTTCTGTCGGTGGCGAACTTATCGGGTAAACCGTTTCTTGAGATTTTGGCTCTGGATTCC
CACTTTCTGTTGGGAATGACGGAATGTAGGTTCTGTTGGGAATGACGCGGATATAGGTTTCCGTGCGGACGCGTTCCGATTCTG
ACTGCCGCGGGAATGACGGAATTTGGTGTATCCCTAAAAAATAAAAAAGTATTGCAATTTGTTAAAAATAATAA
ATAATAATCCTTATCATTCTTAATTGAATTGGATTAT

SEQ. ID NO: 30

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu opc *Neisseria meningitidis* (séroskopina A)

CAAAGGCTACGACAGTGCAGAAACCGGCAACATCTGGAAGAATCATGTTGTTGGACGCGATTATGCGCAAGCCTGCC
GCAACCGTCCGCTGTGCGAAACGCAACCAACGCAACCGGTTATTTGTCGAAGACCCGTTATAGTGGATTAAATTTAAAT
CAGGACAAGGCGAGGAGCCGAGACAGTACAAATAGTACGGCAAGCGGAGCAACCGCGTACTGGTTTAAATTTAATCC
ACTATATGTGTCGAACAGAGCTTCGGTACGCTGCACCGTAAATTCGCTATGCGCGGGCAGCCTATTTCCGACTGATTA
AAGTGAGTGCAGAAAGCCATCTGAAGGCGATGTTTGAACCTGTTGAAGCGCGCAACAGCTAAGTGCAGCGCGCTGCC
GCTTAAAGGAGACCGGATGCTGATTATCGGGTATCCGGGGAGGGTTAAGGGGTATTTGGGTAAATAGGAGGTATT
TGGGGCGAAAAATAGACGAAACCTGTGTTGGGTTTCCGCTGTGCGGAGGGAAAGGAATTTGCAAGATCTCATCCTGT
TATTTTCAAAAAACAGAAACCAAAAAACGCAACCTGAAATTCGTCATTCCCGCGCAGGCGGGGAATCCAGACCCCAAC
CGGCGAGGAATCTATCGGAAATAACCGGAACCGGACGAACCTAGATTCCCGCTTTCGCGGGAATGACGGCAGAGTGGTTT
CAGTTGCTCCCGATAAATGCCGCCATCTCAAGTCTCGTCATTCCCTTAAACAGAAACCGAAATCAGAAACCTAAAT
TCGTATTCCCATAAAAACAGAAACCAAGTGAAGAATAACAATTCGTTGTAACCAATAACTATTGTTAATTTTATT
AATATATGTAATAATCCCCCCCCCCCCGAAAGCTTAAGAATATAATTTGAAGCGTAACGATTATTACGTTATGTT
ACCATATCCGACTACAATCCAAATTTGGAGATTTTAAT

SEQ. ID NO: 31

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu siaD *Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

ATAATGCAGGCGCTGAAGTTGTTAAACATCAACACACATCGTTGAAGACGAAATGTCTGATGAGGCGCAACAAAGTCATT
CCAGGCAATGCAGATGTCCTATTATGAAATTTGGAACGTTGCGCCCTGAATGAAGAAGATGAGATTAAATTTAAAGA
ATACGTAGAGAGTAAGGGTATGATTTTATCAGTACTCCTTTCTCTGTCAGCTGCTTTACGATTACAACGATATGGATA
TTCCAGCATATAAAATCGGCTCTGGCGAATGTAATAACTACCCATTAAATTAAGTGGTGGCTCTTTTGGTAAGCCTATT
ATTCTCTCTACCGGATGAATTTCTATTGAAGCATCAAAAAGTCGGTAGAAATTTATCGAGAAGCAGGGGTACCTTATGC
TTTGCTTCACTGTACCAACATCTACCAACCCCTTACGAAGATGTTGATTTGGTGGTATGAACGATTATCTGAAGCCT
TTCCAGACGCAATCATTGGCCTGTCTGACCATACCTTAGATAACTATGCTTGGTTAGGAGCAGTAGCTTTAGGCGGTTTCG
ATTTTAGAGCGTCACTTTTACTGACCGCATGGATCGCCGAGTCCGGATATTGTATGCTCTATGAATCCGGATACCTTTAA
AGAGCTCAAGCAAGGCGCTCATGCTTTAAATTTGGCAGCGCGCGCAAAAAGACAGGATTATCGCGGAGAAAAAGCCAA
CTAAAGATTTGCGCTTTGCTATGTCGTAGCAGATAAAGACATTAAGGAGAACTGTTGTCGGGAGATAACCTATGG
GTTAAACGCCCGAGCAATGGAGACTTCAGCGTCAACGAATATGAACATTTATTGGTAAGGTCGCTGCTGCAATATTTCG
CAAGGTGCTCAAAATCAAAAAAATGATTTGAATAATGCTTATTAACTTAGTTACTTTATTAACAGAGGATTGGCTATT
ACATATAGCTAATCTCATTAAATTTTAAGAGATACAATA

SEQ. ID NO: 32

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu ctrA *Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

ATACCTGCACCTGAGTTGCCGACCATAAATTTAGCATGTTTCAATAAGACTAAAAATATTCAAATCGAATGGAAGGAA

TGCAATAAAATTATCAGATTGATATTTAATAATTCTTGCAGAATACTTTCAGTGCCAGTGTCTATTATTAGGGTAGATGC
TAATGATATTTTGGCCACTTAATTCTAATGCTTTGAAATATTGGGCCGATATTGGGCATTAAATGTGCTTCTGTAGTC
ACGGGGTGAAACATAGAAATACCATAATTTTCGTATGGTAAACCGTAATATTCTTGAATCTTCTAAGGATGGGAGGGT
GGAAGAGGCCATAACATCTAAATCGGGGGAGCCGATGATGTGAATATGCTTTCTTTTCTCCCAATTTGCATAGGCGAG
TGACAGCTTGTTCATTTGCTACCAAGTGGATATGAGAAAGTTTACTAATAGAATGACGAATGGAGTCATCTACTGTACCA
GATAGTTCACCACCTTCGATATGGCAAATAAACGGCTGCTTAATGCACCTACAGTTCGCGCTGTAGTGTCTCTAAACG
GTCGCGGTGAATCATGACCATATCAGGTTCAATTTTCATCAGATAGACGAGAGATAAACGTAATGGTATTGCCATAAACCG
CACCCATTGGTTCACCTTGGATTGATTGAAACAGATATGTATGTTGATAGTTCCTCGAGTTACTTCTTGTAGGTT
CTGCCATATGTTTTCATATATGCATACCAAGTTACAAATCAATGCAATCAAGGTCTGGGTGATTTCAATATAGGCTAA
TAAAGGTTTTAGCTTGGCGAAGTCGGCTCTGGTACCTGTAATGCAAGAATTCTTTTCATGATTTTGAATCTATAAGTA
TATATATATAAGTATAAGGAAGTTGGAAAGAATACTAATTATACTCTACGTACTCATAAATTTATTTCGATTAAAGTG
CTATAATTAGGCCATTTATAATTATATTAGGATTGGCTT

SEQ. ID NO: 33

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *lgtF Neisseria meningitidis* (séroskopina A)

TCTTTTTCGGACTGAAAGGACGCATCCTCCGACATCGAGCGCGTGTTCGTCGGCAGCCAAAGGCATAGGTTATGCCTAC
GAAGCCATCAAAATACGGTCTGACCGATATGATGCTGGCGGGCGGAGGCGAAGAATTTTCCCGTCCGAAGTGTATGTTTT
CGACTCGCTTTATCGCGCCAGCCCGCCGCAACGGCGAACCAGGAAAAACCCCGCGCCATACGACGCGAACCAGCGGCGG
TGCTCATCGGCGAAGGCGCGGGGATTTTCGTGCTGGAAGAATTGGAACACGCGCAACGGCGGCTGCGATAATTTACGCC
GAACTCGTCGGCTACGGAGCCCAACAGCGATGCCATACCATATTTCCAGCGCCCGCCCGACGCGCAAGGCGCAATCCTTGC
TTTTCAGACGGCATTGCAACACGCGAGCTTGCGCCCGAAGACATCGGCTGGATTAATCTGCACGCGACCGGCGACGCAAC
ACAACGACAGTATGGAAGCGCGCGCTTGCAGCGGTTTCGGCAACAATACGCCCTGCACGTCCACCAAGCCGCAAAAC
GGACACACGCTGGGCGCGCGGGCGGCAATCGAAGCCGCGTTTCGCGTGGGCGATTGCTGACCGGAAAAAGCAATCCGAAAG
GAACTTCCGCGCCAGCTTTGGGACGGCGAGAAGCATCCCGACCTTCCCGCCATCAACCTGACCGGCGAGCGCGCGCT
GGGAAACCGGAAAAACGATTCGCCCGCAGCTCGTCTGTTGCTTTCGGAGGAAGCAACTGCGTTTTACTCATCGGATGAAAT
AAGTTTGTCAATCCCAACCGCTATGCTATACAATACGCGCCTACTCTTGATGGGTCTGTAGCTCAGGGGTAGAGCAGGGG
ACTCATATCCCTTGGTCTGGTTCGAGCCCCACGGACCCCAATTCGCAAGCCGCGAGCTATGTTTGGGCTTTTTT
GCCGCCCTGTGAAACCAAAATGCTTTGAGAAACCTTGATA

SEQ. ID NO: 34

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *lgtB Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

TAGAAAAATATTTTCGCCCAATCATTAGCCGCGTCTGTAATCAGACTTGGCGCAACTTGGAGATTTGATTGTCGATGAC
GGCTCGACAGACGGTACGCTTGGCATTGCCAAGGATTTTCAAAAGCGGGACAGCCGATCAAAATCCTTGCAACAAGTCA
AAATTCGGCCCTGATTCCTCTTTAAACATCGGGCTGGACGAATTGGCAAGTCAGGAATGGGGGAATATATTGACGCGA
CCGATGCCGACGATATTGCCGCCCCGACTGGATTGAGAAAAATCGTGGCGGAGATGGAAAAAGACCGCAGCATCATCGCG
ATGGGCGCGCTGGCTGGAAGTTTGTGCGGAAGAAAGGACGGCAACCGGCTGGCGCGGCATCACAGGCACGGCAAAATTTG
GAAAAAGCCGACCGCGCACGAAGATATTGCCGACTTTTCCCTTTCGGCAACCCCATACACAACAACGATGATTATGA
GGCGCAGCGTCATTGACGGCGGTTTGCCTTACAACACCGCGGGATTGGCGGGAAGATTACCAATTTTGGTACGATGTC
AGCAAAATTGGGCGAGGCTGGCTTATTATCCCGAAGCCTTGGTCAATACCGCCTTACGCGCAATCAGGTTTCAATCCAAATA
CAGCATCCGCCAACCGAATCGCGCAAGGCATCCAAAAACCGCGAGAACGATTTTTCAGTCTATGGGTTTTTAAAA
CCCGGTTTCGACAGCCTTGAATACCGCAAAATAAAGCAGTAGCGTATGAATTGCTGGAGAAACATTTGCGGGAAGAT
TTTGAACGCGCCCGCGGTTTTTGTACCAATGCTTCAACGGACGGACAGCGTCCCGCGCGCGCTGGCTGGATTTTGC
GGCAGACGGCAGGATGCGGCGGCTGTTTACCTTGAGGCAATACTTCGGCATTTCACCGGATTGCTGAAAAACCGTTGAA
AAACGCCGCTTTATCCAACAGACAAAAACAGGATAAAT

SEQ. ID NO: 35

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *lst Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

GCGCAGCGCTTTTCTTCATCGGTTTGGAGGTGCGGAGGATAATCGGGACGGCAAGCCTTTAGACTGCAATTCCTTTAA
TCGCGGGCGGTGAGTTGAGGTACGGATCGCGTATGTTGCGGAGTTTGTATACGTTTGCATCGGGCTGTTTACCAGGTTTCG
CCCAATTCGGCAAGCGCGTCCGGTACGCGCTCGGCTTCGCTCAGATATTTCGGGGAATGCCGCAAAATACGGCCGAGCAG
GGAAATGTGCGCAGTTTTCATCATCAATATCGGCGTGGCGGGCAACCGCTGCACAATCGGCAGCAGGATTTGGTTCGCCA
GCGCGGGGGCTTCGTGGTATGGGTATAAACAATGGTGGATTTTGAAGTCATAGGATTTCTCTTGTAGGTTGGTTTTT
TCTTTTGGAAACAGATTGCGCGGGGAATGTGCGCGCTTATTATGGCATATTTTGGCGGCTTTGTTCCGCTTTTGTTCGATC
TTGGCGGTGTTTGAACGCGGCGAGCGTGAAAGGAAGGGGAAATGGTTTTCCCGGCTTTGGCGGGGTGTCGGAGGTGCTGT
GCCTGATGTGCGGCGGCATATTTCCGTTGAAATGATTTTATAGTGGTTTAAATTTAAACCACTACAGCGTTGCTTCGCC
TTGTCGTACTATCTGTACTGTCTGCGGCTTCGTTGCTTGTCTGATTTAAATTTAAACCACTATAATTTCCGTTAACTG
TCGGAATATCTGCTAAATTCGCAATTTTCCGCTCGGGCACTCGGGCGGTATGTTAATTTGTCGGAATGGAGTTTT
AGGGAT

SEQ. ID NO: 36

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *msbB Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

GCCCCAGCGGCAACAGACAGCTGCTGAAATCAACCGCTTGGACAGTACGGCGGCGCAATACGACATGCTTGCAGGTTATC
TTGAAAGACTTGGCGGAAAAACCGACCGTTGGCGGTGCGCCTACCGCAAAATGCCGTCTGAACACCCGATTATCCTTTT
GAAAGCGCGATTATGCCCCATACCTTCCCGATATTTCCCAATGTATCAGACAAAAATTTGGAACAATATTTCAAGACCT
GAACGGTACCGAACCTTGGCGGTGTACGATATGCTTTCATCAGGTGGAAAAACCGCTGCTGGTGTGGCTGATGGAAC
AATGCGGCGGCAACCGCTGCAAGCTCCGCTCATGTTGGGACTGAACCGCAATACTTTGCGTAAAAAAGTATTCAACAC
GGTTTGTGTGAATATGTGCGCAACCGTCCGATCTTGGGTATGACCGGGCAGTTCGCTTAACGGGTTTCGGTGTGATC
GATGTCAGGGGGCGGATCATTTTTACGTCGCTCCGGTGCATCAAAACCGCTGCCGATCGCGCTCTGGCAGACAGGAT
TGCGGTGATTGTGGGCATATCGGCGAAGTCGTTACCGTTTACAAGCTCAACAGGCGGCGAGTGGAAACAGGTGTTGCTCA

ACGTC AATCCGGCATCGACGCTGATGCTCGGT CAGGCTAGGGGCGCGGCATTGGCGGCATTGGTCAGCCATAAGCTGCC
 GTTTCGGAATACACGGCTTGCAGGTCAAACAGCGGCTAGTTCGGCAAGGGCAAGCGGCAAAAGAACAGGTGCAGCATAT
 GGTGGTCAGATGCTGGGGCTTTCGGGAACGCGCAGGANTGGCGGCGJACGGTCTTGGCGTCCGCTGACCCACGCTT
 ACCTAACCCAGCGGCTTCCGCCAAACTCAATCCTTCGGGGATGCAGGTCAAGCGCGGCAGGTTTCAATAGTTTCAGACGG
 CATTGTATTTTCCGCTCTGAAAAGAAATGTGTATCGAG

SEQ. ID NO: 37

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
 vzhledem ke genu *htrB Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

CCGCCAAGCGTTTCCCCCTTTGTGCGGGCTTAACATTTGCTTTGTACGGCAGACTTTTCCCTTCATAACGGCGCTTTCC
 GAAAAGACGATGGTAGGCGCGAGTAATTCTCAACCCTTAAGGTACGGTTGGACGAAAAGTTTCCCTTTTATTCCACCT
 GCCAATTTTTCGGCTACACCGAGTGGTCTCGTTAGGTTTGGGCGAAGTACGCCCTTAAAAAACGGACATTCTTGCATG
 CCGCTCTCTAAGGTTTACGGTAAGTTTACCCTTATAAAGAGTTGACTTACCATACTTATCCCTTTAAAACGATATAAG
 GCGACAGCTGTAATACAAGTATGTTGTACGGCAGACTTCTTCTACCAACAAAAAGTTCCCTTTAGAGTTACTCGTTA
 TAGACAAATGAAGGCTTAGCCATAGGCTTCCGGTAGGCTATTTCAACGGCTGGTTCACAGGCTACGCTAAAACCTACGG
 TAGAACCGCGTTCTGGGGTTTCCGGCAGACGGCGCTCTTTGGAACCAAGTTGTGTCCGAACAGGCATAACCGCCGCTTTA
 ATGGTGGTGGCGGGTTACCTGATGTAGTTTCAGCGTGCCTTTGGTAGTTTGGGTAGCCGATGTTGAGGAGGCTCGAC
 CGAAACTACGGTTTGGCGACGCGCCAGCCGACATGATGCTGGTCTTAGAGGCTGTAGCGGGTCCGCACTTGCTTGG
 CTTCCGTAAGTAACTTGGTTCCGCGACCGCTGGTTCCAAACCTACAAGCCGATACGGACGCTGCTTTGGGGCTGGGACTA
 CGGCAACCGGTAGATAATGTGCGTGGCGGACTACGTCCGAGTTTCGCTTAATGCGTTTCTGCGGAGGACGGAACCGACG
 CAGGGCTGCGTTTTCGGGTTGACTGGCACCAATGCTATCGCTTAGGCGGTTTCATTTTGGCTAACTATGGCAGCAGGAG
 AGATACGTTGTGCTGGGCTTTAGCCAACTACTTCTCAACT

SEQ. ID NO: 38

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
 vzhledem ke genu *MltA Neisseria meningitidis* (séroskopina B)

CACAAAAACCAAGTTATGACGGGAATAAGGTACAGCAGCCAAACCAAGGCTTCGCCCTGC
 GTCGGATGGTCCGATAGCCGAAAAATCCGCCGAGCAGCAGCCCAACGGGCTGTCTCG
 TGCAATATTTTGTAGTGCAGACAATGTCTGAAGCGGTTCCAAATGCGCTGCTCG
 TGCAGCGCAGCGCAGCAACCGGCAAGCAGACCGCGGCAACGATATATCAGAAACGCCCT
 GTCCCAACGAAAAACTTCGCCAGATTACGGCGCATCCACCTGATAAATCAACGCGCA
 ATCAGCGCGGCGAGCCAAACCCCGCTACCGCACCGGCGGCACTCGCCAGCTCGGGCTC
 TGTTTGAATACGGCAAGCAGGAAAAAACGCTCTCCAAACCTTCGCGCGCCACGGCAAGA
 AACGCCATACCGACCAAGGCCATCTTTGACCGCTGCCACGGTTCAAGCGCGCTGCACA
 GAATCTGTAAGCTGCCGTTCTATCGAACGGGCGGCTTTTTCATCCATAAAATCATATAA
 GTCAGCATCGCGACAGCAACCAACCGATAATGCCGACGACGAACTCTGTGCTTCTGG
 GGAATCTCGCCCGTTGCCGAATGGATTCCGTACCCGAGCCCAACACATCAAAGAAGCA
 AGAACCAACCCCAACAGACCTTAGGCATCAGTTTGAATGTCCGAGCTGTTTCAGAAAA
 CCGGCAACGATGCCGACGATGAGCGCGGCTTCGATACCCCTCGCGCAACATAATTAATAA
 GCGACAGCATAAACCGCAACGAACGAAGGATGATGAATAATATATATCGGAATATTTTC
 ATTGCTTGAATAACAAATGCAAGTTATTTTATCTGCAGTACCGCGCGGCGGAAGTTC
 CGCAGCTGCAGCTGCGCCCTGTGTTAAATCCCTCTCCACGGCTGCGGCAACCGCGCC
 GAAACCATCTTTCTTATTACTGCGGCAACATTGTCCATT

SEQ. ID NO: 39

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
 vzhledem ke genu *ompCD Moraxella catarrhalis*

GCTGATTGTGAGCAAGCGGGCGCATCAGGGATTACCTTGCAATTGCGAGAAGATCGTCG
 ACATATTCAAGATGAAGATGTTTATGAATTGATTGGGCAATTGACAACACGCATGAATCT
 TGAGATGGCAGTCACTGATGAGATGCTAAATATTGCCCTAAAGGTACGACAGCATGGGT
 GTGTTTAGTACAGAAAAACGCCAAGAGCTGACTACAGAAGGTGGGCTTGATATCGCCAA
 TTTATCAATATTCAAGCATTTATACACAGTCTTCAGCAGGCGGATATTAAGTTTCTTT
 ATTCATCGATCCAGATCCGATCAATTTGATGCTGCAATTGCTTTGGGTGCTGATGCGAT
 TGAGCTGCATACGGGAGCTTATGCTCAAGCGACTTTACAAAATAATCAAAAGCTTGTGA
 TAAAGAGCTTGACCGTATTCAAAAGCGTTGCAATGGCACAATAAATCATCATTATT
 GATTAATGCAGGTGATGTTTACGCGTGATAATGTTGCAGCGATTGCCCAAATTGATGG
 TATTGATGAGCTGAATATCGGGCATGCATTGATTTGAGATGCGATATTTATGGGCTTGA
 TAATGAGTCAAGGCAATGAAAATGGCTTTTATTCAAGATAAAACGACCAATCATTGATG
 CGTTAGAAAGAAAATCGTAAATAATGATGACTATTGTGTAATATTATGATTTTGTTC
 AAAAAAGGTTGTAATAAATTCATTACCATTAAGCTAAGCCACAGCCACATGAATA
 CCTATTGGTTTACTCATTAGTCACTAAGAACTGCAAAATTTTGTAAACGATTATTGGC
 AGGCTTTGGATCGCTATGCTAAAATAGGTGCGGTAATCTTGAATAACCAACCATCTTG
 GAGGAATTTATGAAAAGGATATAACGCTCTTGGCGGTCTCGCAGCGGTTGACGCTCC
 AGTTGCAGCTCCAGTTGCTCAAGCTGGTGTGACAGTC

SEQ. ID NO: 40

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
 vzhledem ke genu *copB Moraxella catarrhalis*

GATGCTGTTAAAGTGGGTATTGGTCTGTTCTATTGTACAAACCGTATTGTTGCAGGC
 ATTGGCGTCCCGAGATAAGTCCATTGATAGTGTGGCAAGTGGCTTAAAGATCGCATT

CCCTTGATTGCCGATGGCGGTATTCTGTTTTTCGGGTGATATCGCCAAAGCCATCGCAGCA
GGCGCTTCATGTATTATGGTGGGTAGCTTGTGGCAGGTACCGAAGAGCACTGGGTGAG
GTGGAAATTATTCGAAGGTCGTTATTATAAGGCTTATCGTGGTATGGGCAGCTTGGGGCA
ATGTCTGGTCAAAATGGCTCATCGGATCGTTATTTCAAGATGCCAAGATGGTGTGAA
AAACTGGTTCAGAGGGTATCGAAGGCGGTCTTATATAAGGCCCTGTGGCAGGCATC
ATCGGTCAATTGGCAGGTGGTCTAAGATCATCCATGGGTATACAGGTTGCCAGACCATC
GAACAGATGCGTAAGAATACAGCTTTGTCAAAGTGACTTCGCGAGGCATGAAGGAATCG
CATGTACACGATGTACAGATTACCAAGAAGCACCCAATTATCGCCAAAATTAACCTAT
TAATAGCAAAATACAAGCACTCATTAGATAGGGTGGGTGCTTTTAGAGCATAAAAATAA
ACTGACACATGACTTATTGTCAATTTTAAAATGCTTTAATTTAGATTTTAAATTAG
ATAATGGCTAAAAATAACAGAATATTAATTTAAAGTTTTCAAAATCAAGCGATTAGATGA
AATTATGAAAAATAAATAAATAATCTGATTATTTTAAACCAATAATATCAATTATCAT
TTACAGAAAAATTTTTTTGATAAAATCTTACTGTACCTTGCTATTTTTCTTATT
ATCATTTTTGGCGGTATTTTCGTTGATTTTAGTAAGTAGATGAGCAAGGGATAATTGAC
AAAAACAAATTTGATTTCAAGCCTCATAATCGGAGTTATT

SEQ. ID NO: 41

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu D15 *Moraxella catarrhalis*

AAAACTGGTGATGTCTTCACTGCTATTTCATGGTGAACCAATCAATGATTGGCTAAGTGCC
ACCAAGATTATTTCAGGCAAAATCCAGAAACCATGCTTGATGTGACAGTCATGCGTCAAGGT
AAGCAGGTTGATTAAATTAATGCCCGGTGGTGTAAAGACACAAAACGGCGTAGTCGGT
CAACTGGGTATTTCGCCCCAGATTGATATCGATACGCTCATTCCTGATGAATATCGTATG
ACGATTCAATATGATGTCGGTGAGGCATTACTCAAGCCATCCGACGAACCTATGATTTA
TCAATAATGACCTTAGATGCGATGGGTAAAGATGATTACAGGATTGATTGGCATTGAAAT
CTATCAGGTCCCATTCGCAATTCGCGATGTTTCTAAGACCAGTTTTGAGTTGGGATTTCAA
GAAGTGTATCGACAGCCGCAATCATCAGTTTAAGCTTGGCAGTACTGAATCTTTTACCC
ATTCCAGTGTTAGATGGCGGGCATTGTTATTTTATACCTATGAATGGATTATGGGCAAA
TCTATGAATGAAGCGGTGCAGATGGCAGCATTAAAGCGGTGGCTTATTGCTTTTTGT
TTCATGTTACTTGAATCAGTAACGATATCATGCGATTTTGGCTAAGTCTGATTAT
CGTACCATTAAACAAAATTTTGGCTTTTTTAAAGCTGAAATACTTGCCAAATTTAACTTT
TGCTTACCTTTACACAAATATAAATTTGGGTGTAGAAAATTTGGATACATTTTATACC
TTATTTTATAGAAAATTTAAAAATTAAGTTTGGATAGACTATGCGTAATTCATATTTAA
AGGTTTTCAGGTCAAGTCAATGCAATGGCTGTCATGATGTAATGTCAACTCATGCACA
AGCGGCGGATTTTATGGCAAAATGACATTGCCATCACAGGACTACAGCGAGTGACCATGA
AAGCTTACAAAGCGTGCTGCCGTTTCGCTTGGGTCAAGTG

SEQ. ID NO: 42

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu omp1A *Moraxella catarrhalis*

ACTTGGCGAAAATACCATTATATCGATTGTGATGTTATACAGGCAGATGGCGGTACAGC
CACAGCCAGTATCAGTGGTGCTGCGGTGGCACTTATTGATGCTTTAGAACACTTGCAGCG
TCGTAAAAGCCTTACCCAGATCCGCTTTTGGGCTTGGTGGCAGCGGTTCTGTGGGTGT
TAATCAAGGCGGTGATTGCTTATTGATTGATTGCTGAAGATTCAACTTGTGATACCGA
TTAAATGTGGTCATGACGCGAGGCAGGTGGGTATTATGAGATTCAAGGCACAGCAGAAGA
AAAGCCATTACTCGTGCTGAAGCTAATGCGATGCTTGATTGGCAGAGCTGGGAATTGG
GCAGATTATCGAAGCCCAAAAGCAAGTATTAGGCTGGTGATGCTAATCGTTGAAGATA
ATGGCGTGATCATCACATTAATGGACAAGTAAAGACCCATTATTTGGTGGTTCGATGA
TATTGCTGCTGCTGGGTGTCTTGGTGGCAATCATTGTTTGATTGACCCCGTTTTTTATG
CAATCGGTGGCGTTGGCTTTATTGCAAGTTGTGGTATTGTGTTAATATTCAAAGGCAAA
AAGCCAAAATTTGTCATATGTTTTCACAAGGTGCTTGAAGATTACGTCCAAACGCTTTG
AGATTATTAACAAATCAGTAACCTTATCAGCATCGGCAACAAATCTGCTAAAGATAACA
AAATGACAATTTGATCGGGGCATTGAATATCATTTACAGGTTTGTGATGACCGTG
AAATTAATATAGCCAAACAGGTACTTTTGGGAAAGTCAATCAAAACCAATGCGGTGGCGG
TAACATTGGCTAAGTAGTTGTTGTGATACAGACAGTTGGATGGTCTTTAACTCCACCCA
CCTAACTTTTCTTTGTTGGATTAAAGATATGTTATGATGGGCAGGATTTATTTAA
GTCAATCAATTAATGCAATCAGTTGTCCAGAGTAGCGTTC

SEQ. ID NO: 43

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu hly3 *Moraxella catarrhalis*

GTGATCGGCAACACCCACCATTCAGGAGCAACCAAAATGGCCGTTGCCTGTGCTT
GGTGGTATCATTTGGCAGGGCAATGTGGCTAAGTAGTGGTGTGCCATCAGGTGCGGTGGT
GGTAGTGTACGATTCTGTTATTGTCAAAAATATCCCTTTGGGTGGATGATATCAATG
AAATACCCCTACGGTTGTATGGAATTTATCCATTGTACCACGGTATTGGTCTTTTAAAT
TAACAAGCAGCTTCTAGCAAGTCAAGTTTTTATGCCATTTTTCAGATTTTAAAGGTAC
AATAAAGCCAATTGTTAATAATATGGTATTGTGATGATTTATGATGAATTGCGACCAAAA
TTTTGGGAAAAATATCCCTTAGATGCGTTAACAGATGCTGAATGGGAAGCATTATGTGAC
GGATGTGGCGCGTGTGTTTGGTGAATTTCTTGATGATGACAATGTTAAATTGACCGAA
TATACCGATGTTGCCTGCCAGCTATTGGATTGCTCAACAGGATTTTGCCAAAATCATGCC
AAGCGTCAAAACGATTGTGCCAGATTGATTTCGCTTAACACCTGATATGCTGCTGATATG
CTGTGGTTGCCACGCCATTGTGCTTATAAGCGGTGTATCTTGGGCAAAATCTGCCAGCA
TGCCACAGGCTCATTAACATAGCCAAAACCATGGTGCAGGATTTGCGAAAGTTTCAACT
GCTGGCGGATGTGTGAGTGAGCTTGGTATGAGTGATGAACACATAGAAAGCGAGTGGTG
AAATGGGTAAACCTTGACATGATTGTTGACATGATTGACAGACAATAAAATTTGGCAA
TTTGATAAAATTTGGTATGTGTGATTATCAAAAGCACTTGAATAAAACCGAGTGA
TACGCTAAATTTAGCAAAACCAATCAATTCATCATATTTAATGAACACGAGGTTAAAT
TATCTGCTATGCTGATGACAATTCAGCACTTGGTGC

SEQ. ID NO: 44

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *lbpA Moraxella catarrhalis*

TAACAAAGGCAACCCAACGCGAGTTATTTTGTGCAAGGCGGTCAAGCGGATGTCAGTAC
 TCAGCTGCCAGTGCAGGTAAATTCACCTATAATGGTCTTTGGGCAAGGTACCTGACCCA
 GAAAAAGACAAAGGTTATAGCAAAGATGAGGATACCATCAAGCAAAAGGTCTTAAAGA
 TTATATATTGACCAAGAGCTTTATCCACAAGATGACGATGACGATGACGATGACGATAG
 TTTGACCGCATCTGATGATTACAAGATGATAATACACATGGCGATGATGATTGATTGC
 ATCTGATGATTCACAAGATGATGACGCGATGGCGATGACGATTCAGATGATTGGGTGA
 TGGTGCAGATGATGACGCGCAGGCAAGTGTATCATGCAAGTAAATTCGCCCTGAATT
 TGAACCAAAATCTTGGCCATTATGAGCCTACTCATGAAAAACCTTTGCCCTAGATGG
 TAAAAATAGGCTAAGTTTGTATGTAACTTTGACACCAACAGCCTAACTGGTAAATTA
 CGATGAGAGAGGTGATATCGTCTTTGATATCAAAATGGCAAAATGATGGCAGGATT
 TACCGCCAAAGCCGATTTGGCCAACTATCGTGAAGAAGTGGGTAAACCAAGGTGGCGG
 TTTCTTATACAACATCAAGATATTGATGTTAAGGGGCAATTTTGGCACAATGGCGA
 AGAGTTGGCAGGAGCGTTACATCATGACAAAGGCGATGGCATCACTGACACCGCCGAAAA
 AGCAGGGGCTGTCTTTGGGGCTGTTAAAGATAAATAAGCCCCCTCATCATCGTTTAGT
 CGCTTGACCGACAGTTGATGACGCCCTTGGCAATGTCTTAAACAGCAGCTTTGAAACAGT
 GCCTTGGGCGAATCTTGGATAAATGCACCAAGATTGCTTCGGGCTAATATCTTGATAAA
 ACATCGCCATAAAATAGAAAAATAAAGTTTAGGATTTTTTT

SEQ. ID NO: 45

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *lbpB Moraxella catarrhalis*

CAGCTTGATACATTTGGTGAATATATACCATTTGGTGGTTTGTGGATATTTTACCAGGG
 CTTGAGGGTGTGCTAGCCTAAGCCGTGGCGATGATAAGCAACCACCGCTCAAAATGGGG
 GCGCGGTGGCGATAGCATTTGGTGGCGCAATTTGTTATGAGGTGGCATATCTGAGAGCG
 ACGCGTAAAAATGCACTTGGCAGTAATTTTTATTAACCGTCTCAAACGATGCTTGGTTT
 GGTACAACAGCAGGTCTTTGCGCATTACAAATGGTGCAATGCCAAGCTTGGAGACG
 GGGCGATGGTTTGTGCGTGCAACAAACACGGAGTGACTGCATTAATTGACCATCAAGGA
 CGGATTATCAAGCAGATACCGCAGTTTCAGCGAGATATTTGCGAGGTGATGTACCCAGT
 TATGTTGGACACACGCCCTTATGTTTGGGGGCAATTCCTCATGTTGGGGTTTTCTTTG
 GTGCTGATTTTCTTAGTATCATGGCAAGAAAAATGAAAAATACCACCGCCAAACGAGAA
 AAAATTTATACCGCTGATGGTGTGGTAGACCGCTGAATTTGCCACTTTGGGCGTTAGAG
 CATGAGCAAGATTAGCGGTGGGTGAGCTTTGGTTGTATTACTCATCAGCTACCCGAAA
 CCTGCCAAACATCACCGCCCAAAACCTAAACATACAATGGCTAAAAATATCAGAAAATAA
 CTTGCTGTATTGTAAATCTTATGTTATCATGTGATAATAATTATCATTAGTACCAAGAT
 ATCCATTACTAACTTCATCCCCATCTTAACAGTTACCAAGCGGTGAGCGGATTATCCG
 ATTGACAGCAAGCTTAGCATGATGGCATCGGCTGATTGTCTTTTGCTTGTGTGTGTT
 TGTGGGAGTTGATTGTACTTACCTTAGTGGTGGATGCTTGGGCTGATTAAATTAATTG
 ATCAAAGCGGTCTTCAACACACCAACGAGATATCACC

SEQ. ID NO: 46

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *tbpB Moraxella catarrhalis*

AGTTTGCCTGATTTTGAGAGCCACTGCCATCATGAATTTGTTGGCTAAACACCACTCG
 TATTCTCTTCGGTTTCCCTTTCCATGCAAAACACAGGATACCAAGCGGCGCCATGGCA
 GCGGCGCGGTGGTCTTGGGTGCTAAAAATATTGCATGATGTCCAGCGAATCTCTGCACCC
 AAGGCAACCAAGTCTCAATCAGCACCGCTGTTTGAATGGTCATGTGGATACAGCCTAGG
 ATTTTAGCACCTTAAGTGGTGGTGGTCTTGTATAGCGTTTTCTTAACCCCATCAGGGCT
 GGCATCTCAGCTTCTGCCAAGGCAATCTCACGGCGACCATAATCGGCTAAACGGATATCA
 GCGACTTTATAATCGGTGAAGTTTGGGTGGTACTTGGATTGATTGAGGTAGGCATATCT
 TTATTCCTAAGCTATTTTAAAGTATTTTAAACAAATAATTTGATGAATTTGAGATAATTG
 ATGCTAAAAGGTTGAATGACCAAAACCATCGCTAACAAATCAAGAAAAGACATTTTAAAGCAT
 AAAAAGCAATGTGCTTGTATGGCTTATTATAACAGTTATTATGATAAATTTGGGTAGAA
 AGTTAAATGGATCGTTGGGTAAAGTTTGTGGCTATCCITAAATTAATTAATTTTAAAT
 AATGCTTTACTTTTATTTTAAAAATAGAGTAAAAAATGGTGGCTTTGGGTTTTATCTC
 ACTATGGTAGATAAAATGTATACAAAATGGTTTGTATTATCACTTGTATTGTATTATAA
 TTTTACTTTATTTTACAACTATACACTAAAATCAAAATTAATCACTTTGGTTGGGTGG
 TTTTAGCAAGCAATGGTTATTTTGGTAAACAATTAAGTTCTTAAAAACGATACAGCTC
 ATAAACAGATGGTTTTTGGCATCTGCAATTTGATGCCTGCCTTGTGATTGGTTGGGTGT
 ATCGGTGTATCAAGTGCAAAAGCCAACAGGTGGTCATTG

SEQ. ID NO: 47

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu *tbpA Moraxella catarrhalis*

TTGGGGGGCGGATAAAAAAGTGGTCTTTGCCCAAAGGGGCATATGTGGGAGCGAACACCCTAA
ATCTATGGCAAACATCATCAAAATCACAAAAATACAACGACCATTGGGGCAGACTGGGG
GCAAATTTGGGGCTTTGGTGATGCCAAAAAAGACCTTAGCATTGAGACCTATGGTGAAAAA
AGATTTTATGGGCATGAGCGTTATACCGACACCATCGGCATACGCATGTCCGTTGATTAT
AGAATCAACCCAAAAATTTCAAAGCCTAAACGCCATAGACATATCACGCCCTAACCAACCAT
CGGACGCCCGAGGGCTGACAGTAATAACACTTTATACAGCACATCATTGATTTATTACCCA
AATGCCACACGCTATTATCTTTTGGGGGCGAGCTTTTATGATGAAAAAGTGCCACAAGAC
CCATCTGACAGCTATGAGCGTCTGGCATACGCACAGCGTGGGGGCAAGAATGGGCGGGT
GGTCTTTCAAGCCGTGCCCAAATCAGCATCAACAAACGCCATTACCAAGGGGCAACCTA
ACCACTGGCGGACAAATTCGCCCATGATAAACAGATGCAAGCGTCTTTATCGCTTTGGCAC
AGAGACATTACAAATGGGGCATCAGGCCACGGCTGACCATCAGTACAAACATCAATAAA
AGCAATGACATCAAGGCAAAATATCAAAAAATCAAATGTTTGTGAGTTTAGTCGCATT
TTTTGATGGGATAAGCACGCCCTACTTTTGTGTTTTGTAATAAATGTGCCATCATAGACA
ATATCAAGAAAAAATCAAGAAAAAAGATTACAAATTTAATGATAATTGTTATTGTTTAT
GTTATTATTATCAATGTAAATTTGCCGTATTTTGTCCATCACAAACGCATTATATCATCA
ATGCCCAGACAAATGCCCAAATGCACATTGTCAACATGCCAAATAGGCATTAAACAGAC
TTTTTTAGATAAATACCATCAACCCATCAGAGGATTATTTT

SEQ. ID NO: 48

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu ompE *Moraxella catarrhalis*

AAAGACATTACACATCATCATTCAAAACGCCCAACCATGTACCTCTGCCCCGTGGTCCGCAC
GCCAACGCTTTTTGATGCGGTGCGTTGGGTTCCAGATGGCTTGCAATCATTGGTTTTAT
TAAATTTATACCTTTGGTAGTTTGGCTTTACCTGATATGTCAATTTGATTATCGAAACAA
TACGCAGTTGACCAACATCAATTTTAGCCATTGGCCAAGCACTCAATATTACCGCTCA
TACGACCATGCTTGGTATTAAATCATCATATAAGATACTTTACATCCATTGGAATTGAC
ATTACCCAAATACGGCCATGCCCTAAATTTATGATGATGAATTGGTGCAAAACAAATCCATT
GGCTTATTTTCATCAACTGTCTGCCGTCTGCCGATATTTTATACCCAAACGGTTTGTAT
TGTTGGCGGTGAAAGCTCAGGGAAAACTACCTTGGTGCAAAACTTGCCAAATTTATTATGG
TGCCAGCATCGCACCTGAAATGGGTGCGATTATACACACACTCCCATCTCGGGCGGTAGCGA
ACTTGGCCTTCAATACAGCGACTACGCATCCATTGCCATCAATCACGCCAACGCTATCGA
AACCGCTCGTACCACTGCCAGCTCTGCTGTTACACTGATTGATACTGATTTTGGCACAAC
GCAAGCATTTTGTGAATTTATGAAGGGCGAAGCATCCGCTTGTGCGAGAATTTGCTAA
ACAAATGCGATTGGATTTTACGATTATTTAGATAATAATGTTGCTTGGGTGCTGATGG
CATGGCTAGGCTTGGTATGATCATCAACGCAGTTTGTTCGCCAATAAATTTGCTTGAGAT
TTTGGCAGCATATGATATTAGTTATCATATCATTAAATGACACCGACTACCAACAACGCTA
TCTACAAGCATTAAAGCTTGATAGACAATCATATTTTAAATCATTTTACAAAAATTCATGA
CAATTAATTAGGGAAAAATCTGATGAAATTTGATATTTTAG

SEQ. ID NO: 49

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu uspa1 *Moraxella catarrhalis*

GGATGTGGCATATCTGCCCATCGACCAATACACATCGGTGAGGCTATCAAGATGTGGT
ACGAATTAATAGCCAGTCAGGTAAGGGCGGTGCTGCGTATATCTTGACGCGGCATTTTGG
TTTTAATTTACACGCTGGACACAGATTGATTTTGTCTGTTGGTACAGGCTTATGCAGA
AAGTATGGCGCGTGAATCAAACTGATGAGCTGCTTGAATTTTACCCAAGCGTATCT
TAAGCAAGATAAAATTCGGCTAAGTGACTATACCATCAGCAATAAAGGCGATGCTGTCAG
CTTCCAAGGCCAAGTAGCGACACCCAAAGCGGTGTTGAGGTGATTGGTCAAGGCCAATGG
TGCGTTATCTGCGTTTATTGATGGCTTGGTGAATCCACAGGCAGACAGATTGATGTCAC
CAATTACGCCGCAACACGCCATCGATAACAAACCCATCAAAAAACCGATACGGATAACCA
AACCGATGCCCGCGTCCCGCTTATATCCAGCTGTGCGGTAGAGGGGCGAGATTATTCAGGC
ATCGCCACTTTGCCATAGCACCGTATCCGCCATGCTAAAAGGTGCATTATCCGCTTTGGCA
CAGGCGTGGTAAATCTGACCCAATCAAAATCCTGATGATGGCAGGATTTTATTATTAGT
GGGCTGCCCAACATGATGATCATCAGCATGTGAGCAATGACTGGCGTAAATGACTGAT
GAGTGTCTATTTAATGAAAGATATCAATATATAAAAGTTGACTATAGCGATGCAATACAG
TAAATTTGTTACGGCTAAACATAACGACGGTCCAAGATGGCGGATATCGCCATTACCA
ACCTGATAATCAGTTTATAGCCATTAGCGATGGCATCAAGTTGTGTTGTTGATTGTCA
TATAAACGGTAAATTTGGTTTGGTGGATGCCCATCTGATTACCGTCCCCCTAATAAGT
GAGGGGGGGGAGACCCAGTCATTATTAGGAGACTAAG

SEQ. ID NO: 50

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu uspa2 *Moraxella catarrhalis*

CCCCAAGCTTTCCGTTTGTGTGCTGCTGGTGTGCGGCGGTATACCATGCTGGTGGCTG
CCGATGGTGTGGGCGGTGATCAGATATTGGGCGAGTCTATCGATGATGCGGTGGGTGAAT
GCTTTGATAAAACGGCAAAATGCTCAAACTGCCCTATCCTGGTGGCCCAATATCGAAA
AATTAGCCAAAAACGGCAACCCACAGCCTATGAGCTGCCAAGACCCATGCAGCATAAAG
GGCTGGATTTTTCGTTCACTGGCATGAAAACGCCCATTCATAATCTCATCAAGACACAC
CAAACGCCCAAGGACCCCGCACAGCAGACATCGCCGCAAGCTTTGAGTATGCGG
TGGTGGATACTTTGGTCAAAAAATGCACCAAGCACTACAGATGACAGGCATTGCGCCAGC

TGGTGGTCGCGAGGGGGCGTCTCTGCCAATCAGATGCTACGCCGCCACCTGACCGAGACGC
TCCGCCAAATCGATGCGTGGTGTACTATGCCCCGACCGAGCTATGCACGGATAATGGTG
CGATGATCGGCTATGCTGGCTTTTGTGGCTCAGCTGTGGACAGTCCGATGACTTGGCGG
TTCCGTGTATTCCCCGATGGGATATGACGACGCTTGGCGTATCGGCTCATAGATAGCCAC
ATCAATCATACCAACCAATCGTACAAACGGTTGATACATGCCAAAAATACCATATTGAA
AGTAGGGTTTGGGTATTATTATGTAACCTATATCTAATTGGTGTGATACTTTGATAA
AGCCTTGCTATACTGTAACTAAATGGATATGATAGAGATTTTCCATTATGCCAGCAA
AAGAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAACTCTGTCTTTATCTGTCGGCTGATGCTT
TCTGCCCTGCCACCGATGATATCATTATCTGCTTTTAGGCATCAGTTATTCACCGTGA
TGACTGATGTGATGACTTAACCACCAAAAGAGAGTGCTAA

SEQ. ID NO: 51

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu omp21 *Moraxella catarrhalis*

GAGTGAACCTTATTGTAATAATGATTTCATTAAAGTATCAAAATCATCAACGCGAGCATC
AGGGTTTGTAAATCAATTTTTCCACATAATTATAGCCATAACGCACAGCAAGCGTAGT
TATGCCAGCGGCTTGGCCTGATAAAATATCATTTTTGGAAATCACCACCATATGGCATC
AGTCGGTGCGATGCCAGTGATTGACACAGGTATAATAAGGCGTTGGGTGGGCTTTTT
GACGCTGAGCGTATCACCGCCAATCATTGGTCAAAACAGTGTACGCGATCCAAATGTGA
TAAATTTTAGGCAAAATAACGCTCAGGCTTATTGGTACAAATTGCCAAATAAACCCCGC
TGCTTTTAATCGTTCAAGCCCTTGTATAACCCCTGCATAGCTTTGCGTATTTCAATTGT
TTTATGGGCATATTCTGCCAAATAAATCACTCATGGGCATGGTGAATCATAGTCGTATCATA
GATATGATGTGCTTGCATTGCTCGCTCAACCAATTTTAGCGAACCATGGCCACCGAGCT
TTTGATGATATCAATTGGCATAGGCGGTAAGTTAAGCTTGGCATACATGCCATTGACCGC
CGCCGCCAAATCAGGGGCACTATCGATAAGCGTACCATCCAAATCAATATAATCAGTTT
TTTGCCAGTCATTGACAGTGTTTGCATGCTTTTCCCTTATTCTTAAATTTGGCGGCTGTT
TGGTATTTTAAATCAGTCAATTTTACCATTGTGCATATAATGACAAAGTCAAAATTT
AGCAATATTTTGTGCTATTTTGGCGAAGTTTATGAAAACCTGGTCAATTGGTTGCAAAA
CTTTACACAGTACCTATAAACTTGCACAGTTAATAAGAAATATTTTGTACTATAGGGG
CGTCAATTGGAAACAAGCAGTTATTTGTAAATAGTTATTTGCAAAAGACGGCTAAAAGAC
AGAACAGCGTTTGTCTTTCAGTGATTAACCTAGGAGAAAAACA

SEQ. ID NO: 52

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu omp106 *Moraxella catarrhalis*

TTGATCGGTTTTGCCCACTGTTTCATGATTTACTCAAACAGCGCGCTTGATCGTGCTG
GCAGGTCTGACCCAAACCAACCCAGCGGTCTCGATGCGCTACTGCGCTTATGTTACG
CTTGATACGCCATTTTGTATGCAGATGCCCAAGACTGCCATTGGCAACGCTTAAGCGGC
ATCAAACTTACCAACCCATAAGCGATATGCCATGAGCCACAAACCTAAGCCAAACCGCT
ATATCAACAAGTTGAGCAGACCGCCAGCGTTATTTGAGACATTGGCGGATGCTCATA
TCATGATGCTATGCCACTTTTTTGGCGGAATTTGAAAACCGCTGCTCATCGCCGCACT
CAATCAGCAGCGACGGCAATCAGTCAAAACCGCCAAATCCTTGGTATCAATCGTGGC
ATTACGCACCCAAATGAAAACCCATCACTTACTTTAGACCGCCAGTTATCGCCATGGATA
TGGGCAGGTGTGCTCGCTGCGGTATGATGGCGATGACACCCCATTTGCCCATATCTGC
ACGATTTGACATGATTTAACATGTGATATGATTAAACATGTGACATGATTTAACATTGT
TAATACTGTTGCCATCATTACCATAAATTTAGTAACGCATTGTAAAAATCATTGCCCT
TTTTTTATGTTGATCATATGAATAGAATATTATGATTGTATCTGATTATTGTATCAGAAT
GGTGATGCTACGAGTTGATTGGGTTAATCACTCTATTATTTGATATGTTTTGAACTA
ATCTATTGACTTAAATCACCATATGGTTATAATTTAGCATAATGGTAGGCTTTTGTAAA
AATCAGATCGCAATATTGTTCTACTGTTACCACCATGCTTGAATGACGATCCAAATCACC
AGATTCATTCAAGTGATGTGTTGTATACGCACCATTTACCCTAATTATTTCAATCAAA
GCCTATGTCAGCATGTATCATTTTTTAAAGTTAAACACC

SEQ. ID NO: 53

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu HtrB *Moraxella catarrhalis*

ACTATTCTGCTTTTTGTTTTTACGGAATGCGAATGCCCAACTCAGCCACTGGCGATTAT
CAACTTCAGCAGGTGCTTCGGTCAATGGGCAATCTGCCGTCTTGGTTTTTGGGAAGGCGA
TCACATCAGCGATTGAGCTGGCACCACCATCAGCATAATCAGGCGATCTAGACCAATG
CCAAACACCGTGGCGGGTGCACCAAAACGCAATGCATCCATCAAAAATTTAACTTAA
GCTCTGCTTCTCTTTAGAAATACCAAGGCATCAAAATACCGCTCTTGCATGTCAACCG
TATTAATACGCAGCGAACCGCCACCAATTTCTGTGCCATTAGTACCATGTCATAGGCAA
TGGATAGGGCGGTTTGGGACTTTGTTGAGTTCTCAACCGAGCCTTTTGGGCGTGTAA
AAGGATGATGAACCTGATGCCACTTACCATCATCAGTTTCTCAACATTGGAAAATCAA
CGACCCAAAGCGGTGCCCATTCACAGGTAAATAAATTTAAATCAGTACCGATTTTAAAC
GCAATGCACCCATAGCATCATTGACGATTTTGGCTTTATCGGCACCAAGAAAATGATAT
CGCCAGTTTGGGCAATCGGTACGCTCAATCAGCTCAATCAAAACCTCATCGGTCATATTT
TAATGATGGGTGATTGTAATCCTGATTCTTTTTCAACGCCATTATTGATATTGCTTGGCT
CATCAACTCTTAAATATGCAATCCACGAGCGCCATAAATACCAACAAATTTGGTGTACT
CATCACTGCTTGGGACTCATGTTACCGCCATTGGGAATGCGTAAGGCAACACACGGC
CTTTAGGATCTTGGGCGGGCCCTGAAAATCTTTAAATCAACATGTTGATGATGTCAG
CAACATCAATAAGTTTAAAGGGAATGCGTAAATCAGGCTTATCTGAGGCATATCAGCGA
TGGCATCTGCGTAAGTCATGCGGGGAAGGTATCAAACTCA

SEQ. ID NO: 54

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *MsbB Moraxella catarrhalis*

TGGATCATATTCTTTATTAAATGGTACTGTTTAAACCTGTATTTTAAAGTTTATTGGGTCA
TATTTTCAAGCTCATCCCATCGCTCAAGCTTCATCATCAAAAGCTCATCATCTCTACCA
ATCGCTCACCAGCCTTCGTTGCTGCCGCCAAATCGGTATTAAACCATGAACCATCTTCAA
TCTTTTGGCAAGCTGTGCTGCTGCTTGTTCAGTGCAGCAATTCATTAGGCAATCTT
CAAGTTCACGCTGCTCTTTATAGCTGAGTTTGCCTTTTGGGCAACGCTGATTGAGGTG
GTTTGATTGGATGGGTTCAGCGGGTTTGTGCGCTTAGGTTTATTGCTGTGGCGTGAT
GAGCAAGCCATCTTTTCATGCTGTTGTACATAGTCTTCATAACCGCCACATATTCCAAAA
CGATACCGTCCGCTGACTTATCAGTATCAAAATCCCAAGTTTGGGTAACACATTATCCA
TAAAGCACGGTTCATGGCTGATGAGTAATACCGTGCCTTTAAAAATTGACCAAAAATCTT
CTAAAAGCTCAAGTGTGCCATATCCAAATCATTGGTAGGCTCATCAAGCAACCAAAATCAT
TGGCAGGTTTTCAGCAATAATTGGCCAAATAAAACGGTGCCTTTTCCCGCTGATAGTG
CTTTAACAGGTGTGCGAGCACGATTGGCGTGAATAAAAAATCTTGAATAGCTTAAAA
TGTGCGTAGTTTTCACCAACATCGACATGGTCAGAGCCTTCGAAACATTATCTGCGA
TAGATTTTTCAGGCTTAGGTCGTCTTTGAGTTGGTCAAAAAAGCAATATTAGATTGG
TGCCAGCTTAACTGAACCTGACTGAATCGCTGAATCATCAAAACCAAAATGCTTTTAA
TTAAGGTTGTTTACCAACGCCATTTTGGCAATGATACCAACTTTATCACCACGAACAA
GCAGGTTGAAAAATCCTTAACTAAGGTTTATTGTCGTAT

SEQ. ID NO: 55

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *PilQ Moraxella catarrhalis*

CAACTTGAAATCAGCTCAATGCTCTGCCACGCCACAGCAGGATGAGCGAGATTATCGGA
ATGATAAATACCAAGACCAAGCGGTTAATGTGAGGTGGTGAATGATCAGTTCAAGCA
GGTCGTGAACAGGATTATTATACCGAACGCCCTATCGCAGTGAGTGCACAGGGGATTAT
CATGCTTTGGGTCGATGGTTACTTGAGTTGTGAGAGGCTAACCATTTGCTGACAGTGCAT
GATTTTGATCTGAAGGCTGGTTTGAACCATCAGCTGATGATGATTGTCAGATGAAACT
TATCAAGCGAACAACGCCCAAAACCAAGTTGCTCAGCAGGTGCTGATGTTCAATGAATA
TTATCGGTTGGGCTTTTGGGTGCTTGGATTGGGTTGGGATTGATGCTGATAGCAC
CAGTCAAGTTGTTGATGATAGCTTGCACATATTACCATGAAGAGCTATGGCGATCAG
TGAGCCTGTGCCGATACCTTATCTGTGCCGATGATATATCAGCAAGGCAAGATCTTT
TATCAATCCTTATAGAAATGTTGAGGTTCTTGATACCAATCATGCCGCTGATCAGCAAGA
TGAGCCAAAAACCGAATCTACCAAGCTTGGCCTATGGCAGACACTATGCCATCTCAGCC
ATCTGATACCTCATCAGTCTGCCAAGGCTCAGGCACAAGTCTTCAAAGGCGATCGGATAGT
CATTGATACCAACCGGTTTTCGAGAGCCTTTAGAAAGCTATGAGTTATCAGCCTACGCTA
TCATGGTCGTATTTTGTGATGATGTTAGACTTGTGGCACTCATTATGAGTCTGATGGCAT
CGTTATCGTGTGAGTACTGGACAATATCTTGGTAAAAATCAGCGAAAAATACCCATAT
TGACAGTGTGATCAGATCATCTGATTGAAGCGGTCGCTGATACACAAGTGGCTATTATCG
CCGTGATGTAAACATTCAATTTATTTCATAAGCAATGACAC

SEQ. ID NO: 56

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *lipo18 Moraxella catarrhalis*

TTCATGCAACAAGCGACCATCTTGGCCGATGATACCATCCTGCTCAGCTAAGAAATCAG
TTTATCAGCTTGCAGGCAATGGCTGTGGTCAGTGCTACATCTTCTGCCAATAGATTAAA
AATTTCCGCCGTAACCGAAAAACCTGTGGTCTAGTAGGACAATATGGTCATTATCCAA
ATTATGGCGAATGGCATCGACATCAATTGAGCGTACCTCAGCTGCTATGATAATCCAT
ACCATCTCTGATGCCGTAAGGGCGAGCGGTGACAAAAATTACCGAAATGGCATCAATACG
AGATCCGTACATTGGGGAGTTAGCAAGCCCCATCGACAGCCGAGCTTCGATTGTAGACG
AATTGAGCCGACTGCCTCCAAGATGGCAGGCATAGATTATACGTTGTACAGGCACATT
CTCATGTAGGTTTGTATCAGCTTGCATTTTGTAAATTTTTCACCTTGTGGGCGTAC
ACCATGCCAAGCAACCAATTTGATGCCCAAGCTGTGTAGCAGTGCATAATCATGAATCAG
CGTACTAAAAATTGTCAGGCGAGCGGCTCATCACCACCAATACCAAAAGGTTTGGC
ACGATGGGTGTTAATGTACGGGCGAGAATTACGAAACCAATGCAAGGTGTGAGTGCAGG
AGTGTCTGTAGGTGCTGACAGAAATCATGAATGCTCCAAAGAGTCAATGGCTGGTAAA
ATAAGAATGGCGAACAATATATGGCGAGAGCGTCTGATGTTGGTCAATGTCCCAATTAAT
AACTATCAAGATACCATCATACCATAGCAAGTTTGGCGAGTGCACAGCGAATTTATC
AGCTTGATAAGGTTGGCATATGATAAAATCTACCATCATCGTCCGAGTTTGTAGCATGT
GTAAGTAGTTACCATATAATTAACAGTCAAGAAATCACACCTCATCAGCTGTGCTATG
CTTATGGGCACATAAACTTGACCAACACAGGATAAATTTA

SEQ. ID NO: 57

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu *lipo11 Moraxella catarrhalis*

GGCATACTTTTGCATGCTTTATTTTGGCATACTGCTATAAGCCATTGCTACTTTTAA
TCATTATCCATATGTCCAATAATGTGCTTTATGTAATTTAGGCACTATTAACTCGTG
CCACTGTTAACTTACGATAAAAATCTTAACAATGAATCAAGCATCGATTGGCTGTT
AAATGATAAGCTTATATTTAATTTAAATTCAGACTAAATGATTGTAATAGGACATATCAA

GGTTGAAATCAAAAATTTGGAGAGTTATGTACGATAATGATAAAAAATGACCACCATC
GTAGGGGTGTTGTATACGGTGTCTTATATTGCCATATGGTTGGTCAGTGGCTATATTTTA
TGGGGCTGGATTGGTGTGACAGGATTTACTCGTGGGATACTTTGGCTGATCGCTTGGATG
ATTGTGGGTACGATTGCTGATAGAATTCTGATACCGATTATTTTGACCGTCTGGTTGGG
TTATTTTCTATCTTTTTGAAAAAGGCGATAATTTGGTTATTTTTCACAAAAATCAT
GATTTTTTTGTAACATCTAAAATATCAATTATGTTATATTATGTGATAAAGATGGG
CATGCTTAAGTTTTGGATTGCAAAAATCTTAATATCATCACTGACCAAAGCTGTGATGAT
ATCAAAACTTTATCAAAGTCTTAGGGTATTATCAAGATATCATACCAAATGAATACTTA
CCCACTTACTATAAAAAATCAATGATATGACTGTGATTTTATTATCATAGATACAAAA
TCAAAACGCATGAGCCAAAGGTATGATGAATGAATACAAAATTCGCACACATTATGACA
ATCTAAATGTCGCCAGAACCGTGACATTGCGGTGATTTGGTGGGATAGGGGTCAAGCCA
GTGCGATTAAAGCTAAATTTTATGTGGGCAATCGCTGACTTTATTTTATTTGTGCCAGTT
GGAACAATTCGTGGTCTAATGTATTTATTTTAAGGAGATAA

SEQ. ID NO: 58

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu lipo10 *Moraxella catarrhalis*

TCTGGTCTACATCCCAAACTATTTACACAAGAAACACTAAAGACAGTGGAGCAGATGACG
CTCAAAAAGGCATCTTATAGTAATTTGACAGTTAATTTTCGTCAAGTCTGTACAAAAA
TACACCATCGTGCAAGAAAGTTTGTACCAATTTAAGCACAATCATTTTGGCACACACTGTC
AAGCAATGCTTCAGGCAAAATTAGCTGCTGGTAAAGATACTTTGGTCTATCATGCAATCGCA
TCAACCCCTTCTTGGTGGCTTGAAGCGATAAGTTTGGCATCTTGCCAAAATGACCATGGT
TTAGACCCCTTGGCGTGGCTTGTGGTATCGCTCCACATGTCGTAGAGTAGATATTCGGTCA
TATCAAAAGGGCGATGGAATGTATGGAATGGTCAATACTAGCCATTTGTAGACCTTGTG
TCATCAGGCTTAGCCCATGACTCATTAAACCTGTGCTGACCAAATAATATCAGACACAA
ACGCAAGTAGTGCTGATGAATGGCAACTGGCTGCTCCCAATATCAGCGATACGCACCC
AATTGGCTTGGCGTGGAGCTCAGGCTTGGGTGTCACAGGGTCTCGTGGTGTGACGGGGC
GGATTTCCGACATGACGCTGACGCATAAATCTTGCTTTGAGTGGTTGGGAAATTTTATGTA
AATAATCCGCTTTGAGTCTTGTCTGGTTTTTAGGCTTTCAGGGGGTGGATAATCAGGCA
TGGTTTCTTGGTAATCAAGCCCGCTTCCATGGGTGAAATGAGGCAATCATCGAAAAA
TGACCTGTTCAATGGTGTATGATTACCGTTTTTGTGCGGTGGTGGCACATATTGCACCG
CAATGACTTCTCGAGCTGATAAATCGCTCCATCAGTAAGCGGCTACTTGTATAGATGA
CTGGTAGACGAATATCGCCACCTCGTAAAAAATAACCATGTAGGCTATGACAAGGTTTAT
CAATCGTTAATGTGTAGCACCAGCAAGCAGCGCTTGGGCA

SEQ. ID NO: 59

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu lipo2 *Moraxella catarrhalis*

TAAATGACCTTACAAAATAAAATTATATGTTCAAAAATCGCTTAAGTATTGAAAAAGC
TATAAAACTTATCTATTAAGCATAAAAGATATTAAGCATAAAAGACGAGAAAAGAGC
AAGCGTCAATGATGATTTTATATAAAACTTATGAAATTTTCAATTTTTATCGATT
GATTCAGCTTGGCTATCGGTGGTCAACTTTGGCTGCCAAGACATCGCCGGCTTTTGAAA
AATCATCACATGGCAACATGATGATGGTTGAAATCCACTTGACATATACCATGTTGCG
ATGCTCACCATAGTTAATCGCAAGGCTTCCCAAGCCACCACCGCCCAACACACCTGCCAT
TGCAGAAATACCAATCAAGACACCAAGGTCAATGTGACCGCATTAATCAAAATGGGCAG
GCTTTCAGCAAAATAGTATTTGCTGACACCTGCCAATGCGTTGCACCCATAGATTGGC
AGCTTTCGGTCAGTCTTGGGTACTTCTAATAAAGCATTTGGCACTCAAGCGTGCAAAAAA
TGGAAATTTGCTGCCACACTCAAGGGGACGATGGCGGCTGTTGTGCCAAGGTTGTTCCAC
CAAAAATCGTGTGACTGGCATGAGAATTAATGAGCAAAATAATAAAGGACCGGAGCGACC
AATATTAATAAATCAATCCAAAATTAACAATACACTGCGATTTTCAAGGATACGCCCTTT
ATCGGTTAAAAATGCCAAAACCTATCGGTAGCCCAACCAAAACAGCGATGGCAGTGGC
AGCAAGCCCATATAGATGGTTTCCCAAGTGGATTGGGCAACCATCTCCACATTCTTGG
GTGCAATTTCACTGACAAATTTGTGACGATTTCAATCCACATAGCCGATAATCTCAATAT
TGACCCGATGGGTGGTTAAAAATCTATTGCTTGCATGACCGAGGTGCCTTCAACGATAA
GCTCAGCAATGGTAAAGCCAAATTTTATATCACCTGCATAA

SEQ. ID NO: 60

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu lipo7 *Moraxella catarrhalis*

AGTAACAATGGTAAACAAATACAGCAGTGTGCGACAGTCTCAGTACGATGATTCTGAAT
TTGAATATGCAAGGATTTTGGATACGATTTGTGGCATGTCTTGTGCGATAATTTAATTGTTA
TGATTATAAATGCAACCGTATGGTTTTATAATTATCAGCAAAATGATGGCCATGCCTGCTG
ACCAAATACCGTTTTATAGTGTGGGGATGCCATCCTTTATAGTGTGGGGATGCTATCC
TAAACTTAGTGATGGCGCGGGGTTGTTTGGTTTTGGTAAAAAAGGTGCAACACCAG
GTAAATGCTCTTTGGGCTGCAAGTCCGTGATGCCAAAACAGGGCAATTTATCAGTGTGC
CAAGGGCATTTATGCGATATTTAGTTATCTGATTTTATCCGTGATTCCTTTGTTGGGAC
TTATTTGGGTTGGTTTTGATAAGAAAAACAAGGCTGGCATGATAAAATGCCAAAATG
TTGTGGTAAACGCATTCCTGATGGGTGCGCAGTTAAACAATAAACCATCAACGCCAA
GCAGGGCGATGTTTGGCAGTTGGCGGTAGATAAGCTAAACAAGCAGGCTATGAAT
TATTTTAAACCACTTTACCACCCCATTTGTTGGTGAGATTGATATTATCGCCAGACAGCC
TTTGGAGCAATCGCACGTTTGGTGACGCCAAGATTTGTACGGTATTTGTTGAAGTGGC
TAGCCGAACAGTTCTGTGTATGTTACAGCGCTTGGAGTGTACCTCAAAAAGCAGGC
AAAAATCTACCGAACAGCAGAACGATTTTAAATCAATTATCCCAATATATTGATGATGC
ATACCGTTTTGATGTCATGGTTTTGATTTGGTTGATGGATTGATGACATGAATGGAT
AAAAATGCGTTTTGATGGCTCAATGGTGGTGAATTAATCAATCAATCAAGCAATCCGTAG
CTTTACTATAAGATATATCCAGTAATATGGAAACATAGCA

SEQ. ID NO: 61

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu lipo6 *Moraxella catarrhalis*

CGTTTAGCTTCATACGACGACCTTGTGCACCTTCGGGCAACCGAAGCATCAGGCCAGCAT
 CACGCATCCGCAACAAACCCATCATGCCATCAATTCGCTGCTGATATGATATACCCCA
 CCAAAGTAAACCGCTTAAATCGTGGAAATACGCGCTGCTGCTGAGGGTGAGGCTTCAGGCA
 AAACCAAGGTAAACCTTATCCCCCACTTAAGTCCCATGTGAGAGACAAATGGACTCACCTA
 ATATAATACCAAACCTCGCCGATATGTAATCATCCAAATTCGCTGCGGTGATATGCTCAT
 CAATGATAGAACTTGTCTTTTCGTAATCAGGCTCAATGCCAGAAACCAAGATTCCAGTCA
 CCTGACCTTCAGCGGTTAACATACCTTGTAGTTGAATATAAGGGGCAACTGCTTGCACCT
 CTGGATTTCGATTTTGATTTTTCGGCAAGTTCTTGCCAATTTGCAAAATTTCTGTTG
 AGGTAATCGAAGCTTGAGGCACCATGCCAAGAATGCGTGATTAAATTCACGGTCAAAGC
 CATTTCATGACCGACAAACCGTGATAAGCACTGCAACCCCAAGCGTAAGCCCAATGGTTG
 AGATAAAAGAAATAAAGGAAATAAAGCCATTTTACGCTTAGCTTTGGTATATCTAAGCC
 CAATAAATAACGCCAAGGGACGAAACATAAGCTGTGTTCCAAACGACCCCAACCGTGCTAG
 TTTAGCACTTTTTTGGACAAATACCAACATCACATAACAAATGAATCATCAGGTTGGTT
 TTGTTGCGCTTGTGTATCTGTATGATAAGTTCTTGCTAAACAGCTTTTTATGTCAGA
 ATACAGAAAAGGTATATACTTATATTTTAACTTTAAATAGATCTGCTTTTTATACCGA
 TGATTTGGCATGAAGTTTATCGGCTGATATGCTGGATATAAGTTTATCGGCTTGATATA
 AATTTAATTAATCATCAAATTTTAAAGGAATTTATCATT

SEQ. ID NO: 62

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu P6 *Moraxella catarrhalis*

TAAGGATACCAGATTTTGGCTTGTCAATCGTTGTGTTAATCATTGTAACGGTTTATAGTG
 ATTTGCAATTAATAAGGGTAAAAAGTATTTATCAAGTAATAATCTTCTTATATGTGAA
 TATAATGACAAATTTATCACATTTTACAAGGATTTTATCAAGATTAGGATATGTTCC
 AGCTTAATTATTAGTGATGAGCGTGTGATTATTTGGCATCGTTAAATTTATGAGTGCTAA
 AATTGCCAAATGATTAAATTTTGCTAACATGATAGCCCTTTGGTAGGCTTTATTTGGT
 ATTGATGAGCAATAATAATATACCGAGTTAAATGGATTAACTTAACATACGCCAAAACT
 TAACACGAAAAGTAGATGATTATGACAGATACAGTACAAAAGATACAGCACAGTCCCC
 CAAAAAGTTTATCTAAAAGACTACACGCCGCCAGTATATGCAGTTAATAAAGTGGAATT
 GGATATCCGCTTGTGTTGATGATCATGTGCTGCTTGGTGCCAACTTAAATGACACGAGC
 ACACGCAGGCCGAGCTTCGGCTTCTTGGCGGAGATTTAAAGCTTAAAGCATTACCTTAA
 TGGTCAGGAATTAGAGTCGCGAGCGTATCATCTTGATAAGGAAGGCTTAACAATTTAGA
 TGCACCATGTCGCGAGTGATTGAGACATTGGTTGAGATTTCCACCACAAACCAACACAAC
 ACTTGAAGGGCTATATCAAGCAGGAACAGGTGATGATAAGATGTTTGTGACACAATGCGA
 ACCTGAGGGTTTTCGCAAAATCACCTTTTCCCTGACCGCCCTGATGTTTGTGACAGAATA
 CACCACACGCTAGAAAGCACCAAAGCATTTTAAACCTTTGCTTGGCAATGGTAATTTGGT
 TGAGTCAGGAGATGTGGATGAAAAATCGCCATTATACCATTGGCATGATCTACCAAAAA
 ACCCAGCTATCTATTGCGCGCTGTCATTGCCAATCTAGAAG

SEQ. ID NO: 63

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu MsbB *Haemophilus influenzae* (HiRd)

AAATCAAGCGCCTGTGCTGCTGGTGATGGTTGTGGAGACGAATTATATTCTTGGTTTGA
 ACCGCCAAAAACGAGGCACTTCAGTGAGCAACCTAAAGTTACACCCCTGAGCCGTTTTT
 GTGCCAACAGATTTGAACTCACCGAATCGGAGAGAATGGTTAGAATAGCATTGAGGTAA
 ATCAATATGGATATCGGCATTGATCTTTAGCAATATTGTTTTGTTGGTTTTGTGCGCA
 TCATTTATCGATGCAATTGCTGGCGGTGGTGGATTAAATCACCATTCCAGCGTTACTCATG
 ACAGGTATGCCACCAGCAATGGCGTTAGGCACCAACAAATTTGCAAGCTATGGGCGGTGCA
 TTATCCGCAAGCCTTTATTTCTTGGCAAAAAGAGCGGTCAATTTACGGGATATTGGTTT
 ATTTTGATTTGGGTTTTCTTAGGTTCTGCCCCTAGGTACATTATTAATCAATCAATTGAC
 GTGGCGATTTTCAAAAAATGCTTCTTTTTTGATTTAGCCATTGGTCTATATTTTTTA
 TTTTACTCCTAAATTAGGTGATGAAGATCGAAAACAACGATTAAGTTATCTGTTATTTGGT
 CTTTTAGTTAGCCCATTTTATAGGTTTTATGATGGCTTCTTTGGGCCAGGGACTGGCTCA
 ATCATGAGTTTATAGCTGTGTTACTTTGCTAGGATTTAATCTCCCGAAAGCGGCAGCACAT
 GCAAAAGTGATGAACCTTCACTTCGAACCTTGCTTCTTTGCACTTTCTTATTGGGCGGA
 CAAATTTCTTTGAAAGTGGGTTTCGTGATGATGGCTGGGAGCATTTAGGTGCAAAATTA
 GGTGCCAAAATGGTGATGACGAAAGGTAACCTTGATTGACCGATGGTTGTTATCATG
 TCTTTTATGATGACGCTTAAATGGTTTACGATCAGGTTGGTTTCATTTTAAATTCGGA
 AAGCGCGCAAAAGTGGGTTAAATTAATTACATTTTATTA

SEQ. ID NO: 64

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce

vzhledem ke genu HtrB *Haemophilus influenzae* (HiRd)

TTGAAGTCCCAATTTACCCACCACAATTCCTGCGGCAACATTGGCTAGGTAACAAGATT
 CTTGAAAGAACGTCCTATCTGCTAATGTGGTTGCTAATACACTAATGACAGTGTACCCGG
 CTCCCGTCACATCAACACTTCTTTTGCACCGTTGGCAAAATGATAAGGCTTTGATTG
 GCGTAATAATGTCTATGCCTTTTTCAGAACCGCTCACCAAAAGTGGGTTAATCAATAT
 CAGAAATTAATTTAAACCTTCTTAATAATCTCTTCTGATTACATTTACCTACAA

CGGGTTCAAATTCAGACATATTGGGTGTCATAATGTAGCCCCACGATAACGTTCAAAT
CAGTTCCCTTTGGATCGATCAACACAGGCACATTGCGTTTGGGTGCAATTTGAATCATT
TCTGAACATCTTTAAGCGTGCCTTTGCCGTAATCAGAAAGAAATCAAGCACCCTAATTT
TCACCGCACTTTCTAAGTTGCTAATAAATCCTTGCAATCTACATTATTGAAATCTCTT
CAAAATCAAGGCGGAGCAGCTGTTGATGACGAGATAAAATACGTAATTTAGTAATGGTTG
GATGGGTTTCTAATGCAACAAAATTACAATCAATCTTTGTTTCTAATAAGTGGGAAA
GTGCAGAACCTGTCTCATCTTGTCCAATCAATCCCATTAACCTGAACGGGTACATTGAGTG
AAGCAATATTCAATCGCCACATTTGCAGCACCAGCCGCGGCTTCTCATTTTCTGTACGC
GAAGTACTGGCAGTGGTCTTCTGGTGAAATACGGTTGGTTGCACCGAACCAATAACGAT
CAAGCATCACATCGCTAATACAAGTACTTTTGGTGGTTAAATCTGCTGAATATTGAG
CCATTTTAAATCTCTCTATTGTAATAACCAAAATTTGGGCGATTTTACCACAACTCAA
TTTACGATAAACTACGCCCTAACTTACGTGGAAAGAACA

SEQ. ID NO: 65

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu proteinu D *Haemophilus influenzae* (HiRd)

AGCAATAATTATAGCTGGAATATTCTTTAAGATGAAAGAGATCGTATAAGACAAAAGA
ATTTTATATTGGAGAATTATTAGCAATTATTGGTTGCTAATATTGTAATAAATAGTTC
AAATAATGATGGAATACAGACTTTTCTTGGGGCAATATTCTTTTACAGCTATTTT
TATTCAATCTGTACAGAAATTTAATTGTAAGAAAAGTAGCCAAAAGATAAATGCTGTG
AATAAGTGCATCGACAGCAACAATTTTCAGGAGTATTATTTTATGTTAGCTTTAATAC
TAAACAAATATATTTATTACAAGATGTTGGCATTGGAATGTTGATAGGTTTAGTTTGGC
TGGCTTTTATGGGATGCTAACAGGGATGTTGATGGCTTTTATATTGTTCAAAAACAGG
AATCACTGTTTAAACATTTTGAATTTAATTTCTCTTTCAACTGCGATAATAGGTTA
CTTAAACATTAGATGAAAGAATAAATATCTATCAGGGAATTAGCGGTATTATTGTAATTAT
TGGTTGTGATTGGCATTAAAGAAAGAAAACAGGAGTGTGATATATAAAGTAGATGAT
GTTGGTGGAAATAGGTATAGTTAAATATCTGGTTCAATTGGTTTATTAAAGGCGTTAGCA
ATTCTCCATTTAAGTTTATGTTTGAATTAGATATTTTGGGAAAAGATGGAAGATAAAGC
TGTTAAATATGCTGAAACATATGAACATATACCAATCTCAATAAAATAAATCTGCTG
GAAATGATTATAAATCTCTAATTCTAATTCTAGTATGAGAGGATAATGACTATCAATCAGAA
GAATGATTAAAGCCATTAAATAATATTATTGATTGATGACTAATAATCATCAACCTATTT
CAAGTGTGAAACATCTTAGAACTATTAAATATTACCGGAATTAATTTCTGTTA
AAATAGGTAATGATCCTAACAATATATAAGGAGAATAAGT

SEQ. ID NO: 66

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu Hin47 *Haemophilus influenzae* (HiRd)

TAAATCTCCAAAATAAATTTAGATAACGTTGGTCTGTAAGACAAAAATAAAAAAT
GTTCAATAAGAGGAGACAAATTATCTTGTTTAAAGGAAATCGGAGCAGTACAAAACG
GTCTTACAGTAGCAAAATCTATAAATTTATGTTCTAATACGCGCAATTTCTAGTCAAT
AAAAAGGTCAAAAATGAGCTGGATTAAACCGAATTTTAGTAAAGTCTCTCTCTTCCA
CTCGAAAAGCCAAATGTCCGCAAGGCGTATGGACAAATGTACTGCTTGTGAACAAATGAC
TTTATAGTGAAGAACTCAACGTAATCTGTATGTTTGGCCGAAATGTGGTCATCATATGC
GTATTGATGCTCGTGAGCGTTTATTAAATTTATTGGACGAAGATTCAAGCCAAGAAATG
CGGCAGATTAGAACCAAGATATTTTAAATTTCAAGATTAAAGAAATATAAAGATC
GTATCAATCGCGGCAAAAGAAACGGGCGAGAAAGATGCGCTAATTACTATGACAGGTA
CACTTTATAATATGCCAATCGTTGTGGCTGCATCGAATTTGCTTTTATGGGCGGTTCAA
TGGGTTCTGTAGTTGGTGCAAAATTTCTTAAAGCGGCTGAAAAGCGATGGAATGAATT
GTCCATTTGTGTGTTTCTCTGCGAGTGGTGGTCTCGTATGCAGGAAGCATTATTCTCTT
TAATGCAAAATGGCAAAACTAGTGCCTTACTTGTCTCAATGCGTGAAGGAGGTGTGGCAT
TTATTTCAATTAACGGATCCGACTTTAGCGGCGTATCAGCCAGTTTGTGGATGTTAG
GGGATTAAATATTCCGAGCCAAATCTTAAATTTGTTTGCAGGGCCACGCGTTATTG
AACAACTGTGCGTGAAGAAATTTGCCAAAGGTTTCCACGTAGTGAGTTTCTACTTGAGA
AAGGGCAATTGATGATCGTGAACGTTTCAAGAAATGCGT

SEQ. ID NO: 67

Nukleotidová sekvenec oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu P5 *Haemophilus influenzae* (HiRd)

TCACTTAATTCAGCGCATCAATGTTTCTAAAACATCAACAGAATTGACCGCACTTGTA
TCTAAAATTTCCGCATTTATTAGACTGCGGTAATGCCAAAACATGATTAGAGGTTTAA
CCATATTGCAATGAGCCTTGCCAGAGGCATCGGTGTTAATCATTTCCACCTAAAGTCGCT
CGATTGCTGGTGGACAGTTCTGGGGCAAGAAACCAACATGTGGTTTAAAAATTGATTA
AGTTGATCTTTTACTACGCTGCTTGTACTCGAACCAACGTTCTTTTACATTGAGTTCT
AAGATGGCTGTCATATGACGAGAAAGAATCACTATTATATTGTTATTGATGGATTGCCCCA
TTTGTGCCAGTGCCCTCCACCGGAGGCGTAAAGCTGATTGATTGATATTCAAGTAAATTT
GCCAATTTGTTATCCGCACTATATCAGCAACCGTTTTCGGAAGAAAGAAATGCTTGTGGA
AGTTGTTGTTAAAGCTGTTATCCGTAGCCAGACTTAATCTATCTGCATAGTTTGTGCGCA
ATATCCCCCTCAAAATGTTGGCATTGAAGATCATCAAGATAATCAAGTACATATTGTTCA
ACTTGAGGAATGCGATTTAGATTGGCAACATAGTATTGACCCATTTAAACATATCAGA
TGAGGCTTTGATATATCTTAAGGCTAGAATAATGTCGATTAGGAAAGAGAGAGGAGAA
AGTAAAGTCTGTTTAAAGAAAGTGTATTTTGGATAAAACTAAACAAAAATTTCAAAA
GAATTTGATCTTTTCAATTTTATAGGATAATAAGCGCACTTTTGACGTTTCTTTGGGG
TAAACATAAGCAAGGAATTGAATTTGTCAAAGGTAATAAGTAGGGCAATTTCAAAAC
CCTAGTTAAGTACTGTTTATAATGTAGCTTTAATTAAGTTTCAGTATAAACAGGACA
CTTTTATTACTATTGATCACTAAATAGAGGACATCAAAA

SEQ. ID NO: 68

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu D15 *Haemophilus influenzae* (HiRd)

TCGATTGTATCCTATATAAATATAGACGTAAAAAATCATTAAATATGCAACACCGTT
AAGCTTAATAACAGTGCTGCGCCAATTGCGATAACAGATGCTTTGCACCCGCTCAGAAACA
GGTTTTCTTTAACAGCTTCCATTGTTAAAAAACTAAATGACCGCCATCTAATACTGGT
AATGGAAATAAATTCATAATCCCTAAATTTACACTAATCAATGCCATAAACTTAAAAA
TACACCAATCCAATATTTGCTGATGCGCCAGCACCTTTTGCATAGAAATGGCCCACTT
AAATTTATTAATGACAAATCGCCAGTAAGTAATTTCCCTAATATTTCAAGGTTAAAAAGG
GAAAGCTGTCCTGTTTTTCAATGCCTTTTTGTAAGATTCAAGAATACCATATTTAAT
TCAGTACGGTATTCATCCGCTAATTTTGTAAAGGCTGGGCTAACCCCAACAAACCATTTG
CCATTTTGATTACGCACTGGAGTTAGGACTTTGTCAATGTTTCTCCATTACGTTCAACT
TTAATAGAAAAAGATTGCGCTTGTTCGACCTGTTTTATAAAATCTTGCCAGGAAGTGCG
GTTAAATTTCTTTTAAATTTTATCACCGATTGTAAACCAAGCTTCTCAGCGGGAGAA
TTTTGAACAACCTTTAGAAAGCACCATTTCAATTTTAGGACGCATAGGCATAATCCCTAAT
GCCTCAAAAGCACCTTTCTTTTCAGGATCGAATGTCCAAATTTGTAAGATTAAAGTCCGT
TGTTGTTCAATATTAGAATTGAAAGGAGAAAGGCTAATCTCAACATTAGGCTCCCCATT
TTTGTGGCAAGTAGCATATTGATGGTTTCCCAATCTTGAGTTTCTCGCCATCAATTGTA
AGAATTTGCGTATTGGGTTCAATGTGGGCTTGTGCTGCGATTGAGTTTGGTGTATTGAT
TCAATCACTGGTTTAAACCGTTGGCATTCCATAAAGGTAAT

SEQ. ID NO: 69

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu Omp26 *Haemophilus influenzae* (HiRd)

TTTGATAAATATCCTTAATTAATGATGGGTTTAAATATTTCTCTGCCAATTAAATTAG
GCAGAGAACGTTGTTTTGAGTTCTGATGAAGAAAAAGTCAATTTATTAGAAAGAAC
TCCAATACTAAATTTGGAACCTGTCGACATCATCATTTTCAATTTTTAATTGTTTGGC
ATAAGAGAATACCAATGGCCCAATAGGAGATTGCCATTGGAATCCGACACCTGTAGAGGC
GCGAATACGGCTTGATTGCCCATATCGGGTAAGCTTTTTAATACATTGTTATCTAACCC
ACTCTTATCCGATTTTCACTTAGTATTCCAAACACTTGCCGCATCAACAAATAGGGAGGT
TCGGACTGTATTTGGCTTTTATCACTCACAAACCGTGTGGTACAATAAGTTCTGCACT
CGCAGTTGTGATTGCAATACCACCAATCACATCAGAACTTATCTCTTAAAGTAGCCATT
ACCATTAACCATGTTCTGCATAAATTTGCGTTAGGTCCAATACTACCATAAGCAAAACCAAG
TAATGAACCGGATGCGACCCGCTGTATAAGTTTGATAGAACGGTAAACGCTTGTTTCCAAA
ACCATTTGCATATCTGCGATGCTTTTGCAGATACAACCCAGAGGTGATCTCTGTCTAA
TGGGTAGAAACCCCTTACGCTCTGCACCTAGTTTGTAGTATTTGTTATCAGAACCTGGAAT
AGTAACCTCGTCCAAAGAAAGCTTGGCTTTAACCCCTTTAGTTGGGAAATAGCCTCTATTAAG
GCTGTTATAGTTCTCAACCAAAAGAAAAATCAAAGTCATTTGTTTAAATGCCATTACCTTT
AAATTTCAATTGATTAAATATATAAATTACGGTTATATTCTAGAGCAAGTTACTAATTTT
ATTATAGGTATGGCTAATCTACATAATAGGAGTTATTTTCAATTACAGGGAAACCTAA
AGTAACATTACTTTATAAGTCGTACGCTTATAGTTAGAG

SEQ. ID NO: 70

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu P6 *Haemophilus influenzae* (HiRd)

TTAGATTTCTCCTAAATGAGTTTTTTATTTAGTTAAGTATGGAGACCAAGCTGGAAATTT
AACTTGACCATCACTTCTGGAAGGCTCGCCTTAAAGCGACCATCTGCGGAAACCAATTG
TAGCACCTTTCTAAGCCCTGTGTAGAATAAATAATCATAATTCATTGAGAGAG
GCTTGGGCTTTGCGCTAGAAAGATGTACTAAGTACCTCTGAACGCGCTTGTGAGATC
TTGTTTAACTACATTATTTGTTACCATTAATCATCACAAGTGTTTTCCATCTGCACTAAT
TTGTGCGCTACCGGACCACTGCTGTTGCACTACCAAGCTTGCATCCATTGCGATA
AACTTGTGGCGAACCCTTCTATCGGATGTAATAAATTTGAATTTCCGCTCTGGCGACCA
CGCTGGTTTCAGTATTATTACCGCACCACTCGTCAATTGAGTAGGTGTACCGCCATTGTC
TCCCATAAACGTAAATATTGAGAACCAATCAGGAGAAGCAAAAGCTAAACGAGAACC
ATCTGGCGAAAGGCTGGTGGCCATTATGCCCTTGAAGAAGTGCCTACTTTACGTGC
GCCAGAAATTTAAATCTGTACAACAAGTTGTGATTTTTATTTCAAACGATACATAAGC
CAACCGCTGGCCGTGGAGACCAAGCTGGAGACATAATTGTTGGGCACTACGATTGAC
GATAAATTGATTATAGCCATCATAATCTGCTACACGAACCTCATAAGGTTGCGAACCCTG
ATTTTTTGCACAACATAAGCGATACGAGTTCTAAAGGCACCGGATCGCAGTTAATTT
TTCAAAACCTTCATCGCTCACAGTATGCGCGCCATAGCGTAACCATTTATTTGTTACTGT
ATAGCTATTTTGCAATTAACAGTCCCTGGCGTACCTGATGCCCAACCGTATCAATTAA
TTGATAAGTAATACTATAACCATACCCGATGGAACCACT

SEQ. ID NO: 71

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu TbpA *Haemophilus influenzae* (netypovatelný)

GGCGATAACCGAGTTTTTGGGGTATTTAGTGCCAAAGAACCCCAAAACCCCAAAATTA
TCCAGAGAAACCTTAATTGATGGCAAGCTAACTACTTTTAAAGAACTGATGCAAAAC
AATACAACAGCCGATACAACAACCAATAAAACAACCAATGCAATAACCGATGAAAAAAC
TTAAGACGGAAGATATACTAAGTTTTGGTGAAGCTGATTATCTTTAATTGACAAATCAG
CCTGTTCCGCTTTTACCTGAAAAAAATACTGATGATTTTCAATAGTAGTAGGCATCATACT
GTAGGAAATAAACGCTATAAAGTGAAGCATGTTGCAAGAATCTAAGCTATGTAATTT

GGTATGTATTATGAAGACCCACTTAAAGAAGAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAC
 CAAGAAAAAAGAAAAAGAAAAACAAACGACGACACATCTATCGAGACTTATTATCAA
 TTCTTATTAGGTCACCGTACTGCCAAGGCCGACATACCTGCAACGGGAACGTGAAATAT
 CGCGGTAATTGGTTTGGTTATATTGGTGTATGACACGACATCTTACTCCACTACTGGAGAT
 AAAAAATGCTCTCGCCGAGTTTGATGTAATTTTGGCGATAAAAGCTAACAGGCGAATTA
 AAACGACACGATAATGGAAATACCGTATTTAAAATTACTGCAGACCTTCAAAGTGGTAAG
 AATGACTTCACTGGTACAGCAACCGCAACAAATTTGTAATAGATGGTAACAATAGTCAA
 ACTGGAATACCCAAATTAATATAAACTGAAGTAATGGGGCATTATTTGGACCTAAG
 GGTACAGAAATAGGCGGTATTTACCTATAACGGAAATTTACAGCTAAAAATTCCTCA
 ACCGTACCTTCACCACCAATTACCAAAATGCAAGAGCTGCAGTTGTGTTGGAGCTAAA
 AAACAACAGTAGAAACAACCAAGTAATGGAACTACTAAAAA

SEQ. ID NO: 72

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
 vzhledem ke genu TbpB *Haemophilus influenzae* (HiRd)

TAGAATTATATTCTTATACAAATTTGATAATTGTTTCGCATTATCATTTTTTTTTGTAAT
 AATGTCAACTTATAATTTTTAAAGTTTCATGGATAAAATATGAAAAATGGCGTAAAAACAAC
 TTTTCTCTTATCATTAAATAGGCTTATCATTACGAATGTAGCTTGGGCAGAAAGTTGCAC
 GTCCTAAAAATGATACATTGACAAATACGATTCAAAGTGGCGAATAAAAACCTCCTCTT
 TTTCTCTATGCGCTAAGAAAGAAATACCAATAGGCATATTATTTCTTTTCCAAAGCC
 AATTAGCGCACCATCCAAGGCTTGTTTTGGGTGGGTTAATTCCTGCTTTATCAAAATA
 ACACCTAGGCACTCAACTGTTATTACCACTATATAACAATTTCTCAACRAGATAATT
 TCTTACTAACTTGGGCAAGGCTATTGAAGCTCGTGAACAAGGTGATTAACTCAATCTA
 TTGCTTATTATCGTGAATTATTCGCTCGAGACGCATCTTACTACCTTTACGTTATTAAT
 TAGCTCAAGCTCTATTTTTAACTATGAAAAATGAAGCTGCCAAATTCATTTGAAAAAT
 TACGTACAGAGGTAGATGATGAAAAATTTTAGGTGTTATGATCAGTATCTTTAACAC
 TAAATCAGCGCAATCAATGGATATGGCAAGTAGGATTAAATTTTTAAATGATGATAATT
 TGAATAACGCTCCAAAAGTGGCACAAAAATTTGGTAGTTGGACCGCTTGGGAAAAAGAAA
 GTGGGACGGGGTAGGGTATTCTTTATCAGTAGAAAAAAATGGCCATGGGCAGATCAT
 TTTTATGATAAACTATGTTTAAATGGGAATGAAAAATATTATTTGGGATAATAAAAAATACA
 ATGAGGCTACTGTGCGTATAGGTGGTGGTTTAGGCTATCAAACTGCCTCAGTTGAAGTCT
 CGTTGTTCTTTTCAAGAAAAACGCTGGTATGCAGGCGGT

SEQ. ID NO: 73

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
 vzhledem ke genu HifA (pilin) *Haemophilus influenzae* (genom LKP
 sérotypu 1)

TAATAAATTGCTCCATAAAGAGGTTTGTGCTTATAAATAAGGCAATAAAGATTAAATATA
 AACCGTTTATTAATATGCCAAGGCTTAATAAACAGCAAACTTTGTTTTCCAAAAAAG
 TAAAAAATCTTCCATTATATATATATATATATATAAATTAAGCCCTTTTGGAAAAATTT
 CATATTTTTTTGAATTAATTGCTGTAGGTTGGGTTTTTGGCCACATGGAGACATATAAA
 AAGATTGTTAGGTTGGGCGTAAGCCACGCGGAACATCATCAACAACGTGAATGTTGT
 ATTAGGCACGGTGGGCTTATGCTCGCTACGGGGAATGAATAAGGATAAATATGGGCT
 TAGCCCAAGTTTATGGATTAAATTATGTTGAAATGGGGAACAAATGTTTAAAAAAACACT
 TTTATTTTTTACCGCACTATTTTTGCGGCACTTTGTGCATTTTCAGCCAATGCAGATGT
 GATTATCACTGGCACCAGAGTGATTATCCCGCTGGGCAAAAAATGTTATCGTGAAGTT
 AGAAAAAATGATGATTGCGGAGCATTGGTGCAAGCCTGGATTGATAATGGCAATCCAAA
 TGCCGATCCAAAATACACCAAAACCCCTTTTGTGATTACCCCGCTGTTGCTCGAGTGGGA
 AGCGAAATCAGGGCAAAGTTTGGGATTACGTTACAGGCGAGCGACCTTTACCTGATGA
 TCGCGAAAGCCTCTTTTATTTTAAATTTGTTAGATATTCGCGCAACCTGATGCGGCATT
 TCTGGCAAAACACGGCAGCTTTATGCAAAATGCCATTGCGCTCAGTTTGAAGTTGTTTTA
 TCGCCCTGGGAACTCTCGATGGATTCTCGTATGCAATGAAAAAGTAGTGTTTAAAGC
 CACACCTGAAGGGTGTGGTGGATAATCAAACCCCTTATTATATGAACACTACATTGGTTT
 GTTACATCAAAATAAACCCTGGCAAAATGTCAAATGGTTG

SEQ. ID NO: 74

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
 vzhledem ke genu HifE (tip pilin) *Haemophilus influenzae* (genom LKP

sérotypu 1)

TAGTAGATTTCGCGACGGGCAAAAAATACAATGGTGTATTATTAACCTCACTTTGCCAAATG
 GCGAGCCAGTGCCAATGGCATCCACCGCACAAAGATAGCGAAGGGGCATTGTGGGCGATG
 TGGTGCAAGGTGGTGTGCTTTTCGCTAATAAACTTACCCAGCCAAAAGGCGAGTTAATCG
 TCAAAATGGGGTGAGCGAGAAAGCGAACAATGCCGTTTCCAATATCAAGTTGATTGGATA
 ACGCACAAATACAAAGTCAGGATATTCAATGCAAAACCGCAAAATAAATTAAGAGAGG
 ATTTATGCAAAAAACACCAAAAAATTAACCGCGCTTTTCCATCAAAATCCACTGCTAC
 TTGTAGTGGAGCAAAATTATAGTGGAGCAAAATTATAGTGGCTCAAAATGCTTTAGGTTTCA
 TCGTCTGGCTCTGCTTGGCTTGGCTGCTGCTGATTGCTTGTGGCACTGCCTGCTTA
 TGCTTACGATGGCAGAGTGACCTTTCAAGGGGAGATTTAAGTGATGGCACTTGTAATAAT
 TGAACAGACAGCCAAAAATCGCACGGTTACCTGCCAACAGTGGGAAAAAGCTAATTTAAG
 CCACCGCAGGGCAAAACCGCGCTGCTGCTTTTCCATCAGGTTAAAGAAATGCAATGC
 AGATGATGCTATGAAGCTAATCTGCTATTTAAAGGGGGAGACAACACACAGGGCAATC
 TTATCTTTCCAATAAGGCAGGCAACGGCAAGCCCAACGCTGGGCATTCAAATGTCAA
 AGCCGATGGCATAGGCACGCTATCAAGGTGGACGGCACCGAAGCCCAACAGCGAAAAAGC
 CCCCCACACAGGTAAAGCGCAAAACGGCACAGTTATTCAACCCGCTTTGGCTACTTTGG
 CTCGTTATTACGCCACAGGTGAAGCCACCGCAGGGCAGCTTGAAGCCACTGCAACTTTTG
 AATGCACTATACTAAAAATTTTATTATCCAGTGAAAAA

SEQ. ID NO: 75

Nukleotidová sekvence oblasti DNA (1000 bp) proti směru transkripce
vzhledem ke genu P2 *Haemophilus influenzae* (HiRd)

```

1 TTATCCGCTA ACATTTTCATC AGTAATTCCA TGAACITTA TCGCATCAGG
51 ATCANC GGGG CGATCTGGCT TAATATTAAT ATGAYAATTA TTACCTGTGT
101 AACGACGATT TATTAATTCA ACTGCACCAA TTCAATAAT GCAGTGTCTT
151 TCATAATGCG CGCCAAGCTG ATTCATACCT GTAGTTTCAG TATCTAATAC
201 AATTTGGCGA TTGGGATTAA TCATTTGTTT AACCTATCTC TTTCATTAA
251 AATACTTTGCC ATTCTACACA ACAACCTTTT TGTATGCGC AAACAGATTG
301 AAATTTTAC TGATGGATCT TGCTTAGGTA ATCCAGGGGC GGGCGGAATT
351 GGTGCCGTAT TGGCTTATAA ACAACATGAA AAAACACTCT CCAAAGGCTA
401 TTTCCAAACC ACCAATAATC GAATGGAATT ACGCGCTGTC ATTGAAGCAT
451 TAAATACATT AAAAGAACCT TGCTTGATCA CGCTTTATAG TGATAGCCAA
501 TATATGAAA ATGGCATAAC CAAATGGATC TTAACTGGA AAAAAATTA
551 TTGGAAAGCA AGTTCTGGAA AGCCTGTAAA AAACCAAGAT TTATGGATAG
601 CCTTAGATGA ATCCATCCAA CGTCATAAAA TTAATTGGCA ATGGGTAAAA
651 GGCCATGCTG GACACAGAGA AAATGAAATT TGGCATGAAT TAGCAAAAAA
701 AGGGGCAGAA AATCCGACAT TGGAAGATAT GGGGTACATA GAAGAATAAT
751 ACAACTGATA TAACGTCATA TTTTTCGATA CCTAAAAATA TTTAATACTT
801 AAACCTAAAA CAGATAAAAA AATAATCAAA TTCATTTAAA AAATGTGATC
851 TCGATCAGAT TTCAAGAAAA TTTAAATTTT GGAGTATTGA CATCAAAAT
901 TTTTTTTGTA AAGATGCAGC TCGTCCGTTT TGGCGATTGG ACAATTCTAT
951 TGGAGAAAAG TTCAATCATA GATAGTAAAC AACCATAAGG AATACAAATT
1001 A

```

SEQ. ID NO: 76

Nukleotidová sekvence kódující oblasti DNA (částečná) genu HtrB

Moraxella catarrhalis

```

1 TCAGTGCTTG GTTTTTTAAG ATATGTACCG CTGTCAGTCC TGCATGGATT
51 GGGCGGCTGT GCGTCTTATA TTTCTATCA TTGCAGGCTT AGTATTTATC
101 GCAGCATCCA AGCCAATTTA ATCTTGGTTC ACCCCAAGAT GCCAGACGCA
151 CAGCGGCAAA AACTCGCCAA ACAATCCTA AAAAATCAGC TCATCAGTGC
201 AGTCGACAGT CTTAAAACTT GGGCAATGCC ACCAAAATGG TCTATCGCAC
251 AAATTTAAAC GGTTCATCAT GAAGATATCC TAATCAAAGC ACTTGCCAAAT
301 CCAAGTGGTA TGCTTGCCAT TGTGCCTCAT ATCGGCACCT GGGAGATGAT
351 GAATGCTTGG CTCAATACCT TTGGCTCCCC TACTATCATG TATAAGCCCA
401 TCAAAAATGC GCGGCTAGAT CGCTTTGTTT TACAGGGGCG TGAAAGACTA
451 AATGCCAGCC TTGTACCCAC AGATGCTAGT GGTGTTAAGG CAATTTTAA
501 AACACTCAAA GCAGGTGGAT TTAGTATCAT ACTGCCCGAC CATGTACCTG
551 ATCCATCAGG TGGTGAGATT GCTCCTTTTT TTGGTATTAA AACCTAACC
601 AGTACGCTGG CGTCAAAGCT TGCTGCAAAA ACTGGTTGTG CTCTTGTGG
651 CTTAAGCTGT ATTGCGCGTG AAGATGGCGA TGGTTTTGAA ATTTTTTGT
701 ATGAATTTAA TGATGAACAA CTTTATTCAA AAAATACCAA AATTGCAACC
751 ACTGCTTTAA ATGGTGCGAT GGAACAAATG ATTTATCCAC ATTTTTTGCA
801 TTATATGTGG AGCTATCGTC GGTTCAGCA TACACCACTA TTAATAATC
851 CTTATTTACT TAATGAAAAT GAGCTAAAAA AAATAGCCAT AAAGCTTCAA
901 GCCATGTCAA AGGATAGTTA TGAG

```

Proteinová sekvence: 25% identita a 35% podobnost s HtrB *E. coli*

```

1 SVLGLRYVP LSVLHGLAAC ASYISYHCR LSIYRSIQANL ILVHPKMPDA
51 QRQKLAKQIL KNQLISAVDS LKTWAMPPKW SIAQIKTVH EDILIKALAN
101 PSGMLAIVPH IGTWEMMNW LNTFGSPTIM YKPIKNAAVD RFVLOGRERL
151 NASLVPTDAS GVKAIKTLK AGGFSIILPD HVPDPGSGEI APFFGIKILT
201 STLASKLAAG TGCAVLGLSC IRREDGDGFE IFCYELNDEQ LYSKNTKIAT
251 TALNGAMEQM IYPHFLHYMW SYRREFKHTPL LNNPYLLNEN ELKKIAIKLQ
301 AMSKDSYE

```

SEQ. ID NO: 77

Nukleotidová sekvence kódující oblasti DNA genu HtrB *Neisseria*

(meningokok B)

```

1 ATGTTTCGTT TACAATTCGG GCTGTTTCCC CCTTTGCGAA CCGCCATGCA
51 CATCCTGTTG ACCGCCCTGC TCAAATGCCT CTCCCTGCTG CCACTTTCTT
101 GTCTGCACAC GCTGGGAAC CGGCTCGGAC ATCTGGCGTT TTACCTTTTA
151 AAGGAAGACC GCGCGCGCAT CGTCGCCAAT ATCGCTCAGG CAGGCATGAA
201 TCCCGACCCC AAAACAGTCA AAGCCGTTTT TGGGGAAACG GCAAAAGGCG
251 GTTTGGAAC TGGCCCGCGG TTTTTCAGAA AACCGGAAGA CATAGAAACA
301 ATGTTCAAAG CGGTACACGG CTGGGAACAT GTGCAGCAGG CTTTGGACAA
351 ACACGAAGGG CTGCTATTCA TCACGCCGCA CATCGGCAGC TACGATTGG
401 GCGGACGCTA CATCAGCCAG CAGCTTCCGT TCCCGGTGAC CGCCATGTAC
451 AAACCGCCGA AATCAAAGC GATAGACAAA ATCATGCAGG CGGGCAGGGT
501 TCGCGGCAAA GGAAAAACCG CGCCTACCAG CATACAAGGG GTCAAACAAA
551 TCATCAAAGC CCTGCGTTTG GCGGAAGCAA CCATCGTCTT GCCCGACCAC

```

601 GTCCCTCCCTCTCAAGAAGG CGGGGAAGGC GTATGGGTGG ATTTCTTCGG
651 CAAACCTGCC TATACCATGA CGCTGGCGGC AAAATGGCA CACGTCAAAG
701 GCGTGAAGAAC CCTGTTTTTC TGCTGCGAAC GCCTGCCTGG CGGACAAGGT
751 TTCCGATTTGC ACATCCGCCC CGTCCAGGG GAATTGAACG GCGACAAAGC
801 CCATGATGCC GCGGTGTTCA ACCGCAATGC CGAATATTGG ATACGCCGTT
851 TTCCGACGCA GTATCTGTTT ATGTACAACC GCTACAAAAT GCCG

Proteinová sekvenca 30% identita a 38% podobnosť s Htrb *E. coli*

1 MFRLQGLFF PLRTAMHILL TALLKCLSL PLSCLHTLGN RLGHAFYLL
51 KEDRARIVAN MRQAGNPD P KTVKAVFAET ARGGLLELAPA FFRKPEDIE
101 MFKAHVHWEH VQALDKHEG LLFITPHIGS YDLGGYISQ QLPPLTAMY
151 KPPKIKAIK IMQAGVRGK GKTAPTSIOG VKQIKALRS GEATIVLPDH
201 VSPQEGGEG VVWDFGKPA YMTLAAXLA HVKGVKTLFF CCEPLPGGQG
251 FDLHHRPVG ELNGDKARDA AVENRNEYW IRRFPTQYLF MYNRYKMP

SEQ. ID NO: 78

Nukleotidová sekvenca kódujúcej oblasti DNA genu HtrB *Haemophilus influenzae* (netypovateľný)

1 ATGAAAAACG AAAAAGTCCC TCAATTTCAA CCGCACTTT TAGCCCCAAA
51 ATACTGGCTT TTTTGGCTAG GCGTGGCAAT TTGGCGAAGT ATTTTATGTC
101 TTCCCTATCC TATTTTGGCG CATATTGGTC ATGGTTTCGG TTGGCTGTTT
151 TCACATTTAA AAGTGGGTAA ACCTCGAGCT GCCATTGCAC GCCGTAATCT
201 TGAACCTTGT TTCCCTGATA TGCTGAAAA CGAACGTGAG ACGATTTTGC
251 AAGAAAAATC TCGTTTCACT GGCATGGCAA TTATCGAAAC TGGCATGGCT
301 TGGTTTTGGT CGGATTCACG TATCAAAAAA TGGTCGAAAG TTGAAGGCTT
351 ACATTATCTA AAAGAAAAATC AAAAAGATGG AATGTTCTC GTCGGTGTTC
401 ATTTCTTAAAC GCTAGAACTT GCGCGACGCA TCATTGGTTT ACATCATCCT
451 GGCATTGGTG TTTATCGTCC AAATGATAAT CCTTTGCTTG ATTGGCTACA
501 AACACAAGGC CGTTTACGCT CCAATAAAGA TATGCTTGAT CGTAAAGATT
551 TACGCGGAAT GATCAAGCT TTACGCCACG AAGAAACCAT TTGGTATGCG
601 CCTGATCAG ATTACGGCAG AAAAATGCC GTTTTGTTC CTTTTTTTGC
651 AGTACCTGAC ACTTGCACTA CTACTGGTAG TTATTATTTA TTGAATCCT
701 CGCAAAACAG CAAAGTGATT CCATTGCGC CATTACGCAA TAAAGATGGT
751 TCAGGCTATA CCGTGAGTAT TTCAGCGCCT GTTGATTTTA CGGATTTACA
801 AGATGAAACG GCGATTGCTG CGCGAATGAA TCAATTCGTA GAAAGGAAA
851 CATGAAGGG CATATCAAA TATATGTGGC TACATCGCCG TTTTAAACA
901 TCGCCAGATG AAAATACGCC TAGTTTATAC GATTAA

Proteinová sekvenca 57% identita a 66% podobnosť s HtrB *E. coli*

1 MKNEKLQFQ PHFLAPKYL FWLGVAIWR ILCLFPYILR HIGHGFGLF
51 SHLVGKRRR AIARRNLELC FPDMPENERE TILQENLRV GMAIETGMA
101 WFWSDSRKK WSKVEGLHYL KENQKDGIVL VGVHFTLEL GARIIGLHP
151 GIGVYRPND PLDDWLQTOG RLRSNKDMLD RKDLRGMKA LRHEETIWA
201 PDHDYGRKNA VFVFFAVPD TCTTTGSYYL LKSSQNSKVI PFAPLRNKDG
251 SGYTVSISAP VDFTDLQDET ALAARMNQIV EKEIMKGISQ YMWLHRRFT
301 RPDENTPSLY D*

SEQ. ID NO: 79

Nukleotidová sekvenca kódujúcej oblasti DNA genu MsbB *Haemophilus influenzae* (netypovateľný)

1 ATGTCGGATA ATCAACAAA TTTACGTTG ACGGCGAGAG TGGGCTATGA
51 AGGCACTTT TCATGGTCGT ATTTAAAGCC TCAATATTGG GGGATTGGC
101 TTGGTATTTT CTTTTTATTG TTGTTAGCAT TTGTGCTTT TCGTCTGCGC
151 GATAAATTGA CGGAAAATT AGGTATTTGG ATTGGCATA AAGCAAAGAA
201 ACAGCGTACG CGTGACAAA CTAACCTGCA ATATTGTTT CCTCATTGGA
251 CTGAACAACA ACGTGAGCAA GTGATTGATA AAATGTTTG GGTGTGCGCT
301 CAGGTTATGT TTGGTATTGG TGAGATTGCC ATCCGTTCAA AGAAACATT
351 GCAAAAACGC AGCGAATTTA TCGGTCTTGA ACATATCGAA CAGGCAAAAG
401 CTGAAGGAAA GAATATTATT CTTATGGTGC CACATGGCTG GCGGATTGAT
451 GCGTCTGGCA TTATTTTGA CACTCAAGGC ATGCCAATGA CTTCTATGTA
501 TAATCCACAC CGTAATCCAT TGGTGGATTG GCTTTGGACG ATTACACGCC
551 AACGTTTCGG CGGAAAATG CATGCACGCC AAAATGGTAT TAAACCTTTT
601 TTAAGTCATG TTCGTAAAGG CGAAATGGGT TATTACTTAC CCGATGAAGA
651 TTTTGGGGCG GAACAAAGCG TATTGTGTTA TTTCTTTGGG ACTTATAAAG
701 CGACATTACC AGGGTTAAAT AAAATGGCAA AACTTTCTAA AGCCGTTGTT
751 ATTCCAATGT TTCTCTGTTA TAACGCTGAA ACGGCAAAAT ATGAAATGGA
801 AATTCATCCT GCAATGAATT TAAGTGATGA TCCTGAACAA TCAGCCCGAG
851 CAATGAACGA AGAATAGAA TCTTTTGTTA CGCCAGCGCC AGAGCAATAT
901 GTTTGGATTT TGCAATTATT GCGTACAAGG AAAGATGGCG AAGATCTTTA
951 TGATTAA

Proteinová sekvenca 45% identita a 56% podobnosť s MsbB *E. coli*

1 MSDNQNLRL TARVGYEAF SWSYLPQYW GINLGIFFLL LLAFFVFLR
51 DKLTGKLGW IGHKAKQRT RAQTNLQYCF PHWTEQREQ VIDKMEAVVA
101 QVMFGIGEIA IRSKHLQKR SEFTGLEHIE QAKAEGKNII LNVPHGWAID
151 ASGIILHTQG MPMSTMYNPH RNPLVDWLWT ITRQREGGKM HARQNGIKPF

201 LSHVRKGMG YYLPDEDFGA EQSVFVDFFG TYKATLPGLN KMAKLSKAVV
251 IPMFPRYNAE TGYEMEIH P AMNLSDDPEQ SARAMNEIE SFVTPAPEQY
301 VWILQLLRTR KDGEDLYD*

SEQ. ID NO: 80

Nukleotidová sekvenec kódující oblasti DNA genu *MsbB Moraxella catarrhalis*

1 ATGAGTTGCC ATCATCAGCA TAAGCAGACA CCAAACACG CCATATCCAT
51 TAAGCATATG CCAAGCTTGA CAGATACTCA TAAACAAAGT AGCCAAGCTG
101 AGCCAAAATC GTTTGAATGG GCGTTTTTAC ATCCCAAATA TTGGGGAGTT
151 TGGCTGGCTT TTGCGTTGAT TTTACCGCTG ATTTTCTAC CGCTGCGTTG
201 GCAGTTTGG ATCGGCAAGC GTCTTGGCAT TTTGGTACAT TACTTAGCTA
251 AAAGCCGAGT TCAAGACACT CTAACCAACC TGCAGTTTAC CTTCCCAAAT
301 CAACCAAAAT CAAAACACAA GGCCACCGCA CGGCAAGTAT TTATTAATCA
351 AGGTATTGGT ATTTTGTAAA GTTTATGTGC ATGGTTTCGC CCTAATGTCT
401 TTAACGCAC TTTTAGCATT TCTGGTTTAC AGCATTGAT TGATGCCCAA
451 AAACAAAATA AAGCGGTGAT TTTACTTGGT GGACATCGCA CGAGCGTTGA
501 TTTGGGCGGT CGGTTATGTA CACAGTTTTT TCGGCGGAC TCGGTGTATC
551 GCCCACAAAA CAACCTTTTG CTTGAATGGT TTATCTATAA TGCACGCCGC
601 TGTATCTTTG ATGAGCAAAT CTCAAATCGT GATATGAAAA AACTCATCAC
651 TCGGCTCAAA CAAGTTCGGA TAATTGGTGA TTCACCTGAT CAAGATTTTG
701 GTCTTGAGCA TGGCGTGATG GCGACCTTTT TTGGTGTGCC TGCAGCAACG
751 ATTACCGCTC AGCGTCGTCT TATTAAGCTG GGTGATTAAG CCAATCCTCC
801 TGTTCATATC ATGATGGATA TGCTCAGACA AACGCCCGAT TATATCGCAA
851 AAGGTCACCG TCCACATTAT CACATCAGCC TAAGCGCTGT GTTAAAAAAT
901 TATCCCGAGG ATGACGAAAC CGCCGATGCT GAACGCATCA ATCGACTGAT
951 TGAGCAAAAT ATTCAAAAAG ATTTAACCCA GTGGATGTGG TTTTCATCGCC
1001 GCTTTAAAC TCAAGCCGAT GACACCAAT ACTATCAACA TTAATG

Proteinová sekvenec 28% identita a 37% podobnost s *MsbB E. coli*

1 MSCHQHOKT PKHAISIKHM PSLTDTHKQS SOAPEKSEF AFLHPKYGV
51 WLAFALILPL IFLPLRWQFW IGKRLGILVH YLAKSRVQDT LTNLQLTFPN
101 QPKSKHKATA RQVFINGGIG IFESLCWAFR PNVEKRTFSI SGLQHLIDAQ
151 KONKAVILLG GHRTTLDLGG RLCTQFFAAD CVYRPNHPL LEWFIYNARR
201 CIFDEQISNR DMKKLITRLK QGRIIWYSPD QDFGLEHGVN ATFFGVPAAT
251 ITAQRRLLIKL GDKANPPVII MMDMLRQTPD YIAGHRPHY HISLSAVLKN
301 YPSDETADA ERINRLIEQN IQKDLTQMWV FHRREKTOAD DTNYVQH*

SEQ. ID NO: 81

Nukleotidová sekvenec kódující oblasti DNA genu *MsbB Neisseria (meningokok B)*

1 ATGAAATTTA TATTTTGT ACTGTATGTT TTGCAATTTC TGCCGTTTGC
51 GCTGCTGCAC AAACCTGCCG ACCTGACGGG TTTGCTCGCC TACCTTTTGG
101 TCAAACCCCG CCGCCGTATC GGGCAAAATCA ATTTGGCAAA ATGCTTTCCC
151 GAGTGGGACG GAAAAAGCG CGAAACCGTA TTGAAGCAGC ATTTCAAAACA
201 TATGGCGAAA CTGATGCTTG AATACGGCTT ATATTGGTAC GCGCTGCGCG
251 GCGCTTTGAA ATCGCTGGTG CGTTACCGCA ATAAGCATT TTTGGACGAC
301 GCGCTGGCGG CCGGGGAAAA AGTCATCATT CTGTACCCGC ACTTCACCGC
351 GTTCGAGATG GCGGTGTACG CGCTTAATCA GGATGTACCG CTGATCAGTA
401 TGTATTCCCA CCRAAAAAAC AAGATATTGG ACGCAGAT TTTGAAAGGC
451 CGCAACCGCT ACGACAATGT CTTCCTTATC GGGCGTACCG AAGGCGTGCG
501 CGCCCTCGTC AAACAGTTCC GCAAAAGCAG CGCGCGGTTT CTGTATCTGC
551 CCGATCAGGA TTTGGGACGC AACGATTCCG TTTTGTGGA TTTTTCGGT
601 ATTCAGACGG CAACGATTAC CGGCTTGAGC CGCATTGCGG CGCTTGCAAA
651 TGCAAAAGTG ATACCCGCCA TCCCGTCCG CGAGGCGGAC AATACGGTTA
701 CATTGCATTT CTACCCGGCT TGGGAATCCT TTCCGAGTGA AGATGCGCAG
751 GCCGACGCGC AGCGCATGAA CCGTTTTATC GAGGAACCGT GCGCGAACAT
801 CCGGAGCAGT ATTTTGGCT GCACAAGCGT TTCAAAACCC GTCCGGAAGG
851 CAGCCCGGAT TTTTACTGAT ACGTAA

Proteinová sekvenec 25% identita a 36% podobnost s *MsbB E. coli*

1 MKFIFFVLYV LQFLPFALLH KLADLTGLLA YLLVKPRRRI GEINLAKCFP
51 ENWGKKRET V LKQHFHMAK LMLEYGLYVY APAGRLKSLV RYRNKHYLDD
101 ALAAGEKVII LYPHETAFEM AVYALNQDVP LISMYSHQKN KILDAQILKG
151 RNRYDNVFLI GRTEGVRLV KQFRKSSAPF LYLPDQDFGR NDSVFDVDFG
201 IQTATITGLS RIAALANAKV IFAIPVREAD NTVTLHFYFA WESFSPSEDAQ
251 ADAQRMRNFI EEPKANIPSS IFGCTSVSKP VRKAAPIFTD T*

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Prostředek založený na geneticky zkonstruovaných váčcích z kmene gramnegativních bakterií, vyznačující se tím, že tento prostředek je získatelný použitím jednoho nebo více způsobů zvolených z následující skupiny:
 - a) způsob omezení imunodominantních variabilních nebo neprotektivních antigenů v prostředí založeném na váčcích, kde tento způsob zahrnuje kroky zjištění identity takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene pro produkci menšího množství nebo žádného uvedeného antigenu a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
 - b) způsob regulace ke zvýšení exprese ochranných antigenů OMP v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene pro zavedení silnější promotorové sekvence proti směru transkripce vzhledem ke genu kódujícímu uvedený antigen tak, že tento gen je exprimován ve vyšší míře než v nemodifikovaném váčku, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
 - c) způsob regulace ke zvýšení exprese podmíněčně exprimovaných, ochranných antigenů OMP v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby se odstranily represivní řídicí mechanismy jeho exprese, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
 - d) způsob modifikace podílu lipidu A v bakteriálním LPS v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace genu, který má účast při učinění části lipidu A

LPS toxickou, zkonstruování bakteriálního kmene pro snížení nebo vypnutí exprese tohoto genu, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;

- e) způsob modifikace podílu lipidu A v bakteriálním LPS v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace genu, který má účast při učinění části lipidu A LPS méně toxickou, zkonstruování bakteriálního kmene pro zavedení silnější promotorové sekvence proti směru transkripce uvedeného genu tak, že tento gen je exprimován s vyšší mírou než v nemodifikovaných váčcích, a vytvoření váčků z tohoto kmene;
- f) způsob snížení toxicity lipidu A v prostředí založeném na váčcích a zvýšení hladin ochranných antigenů, který zahrnuje kroky zkonstruování chromosomu bakteriálního kmene pro zavedení genu kódujícího peptid polymyxin A, nebo jeho derivát nebo analog, fúzovaného k ochrannému antigenu, a vytvoření váčků z uvedeného kmene; nebo
- g) způsob vytvoření konzervovaných antigenů OMP v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby byly odstraněny variabilní oblasti genu kódujícího uvedený antigen, a vytvoření váčků z uvedeného kmene.

2. Prostředek založený na geneticky zkonstruovaných váčcích podle nároku 1, vyznačující se tím, že tento prostředek je získatelný použitím jednoho nebo více dalších způsobů zvolených z následující skupiny:

- h) způsob snížení exprese antigenu v prostředí založeném na váčcích, kde tento antigen sdílí strukturní podobnost s

lidskou strukturou a může být schopný indukovat autoimunitní odpověď u lidí, který zahrnuje kroky identifikace genu, který se účastní biosyntézy antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby se snížila nebo vypnula exprese uvedeného kmene, a vytvoření váčků z uvedeného kmene; nebo

- i) způsob regulace ke zvýšení exprese ochranných antigenů OMP v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby se do chromosomu zavedla jedna nebo více dalších kopií genu kódujícího uvedený antigen, řízeného heterologní, silnější promotorovou sekvencí, a vytvoření váčků z uvedeného kmene.
3. Prostředek založený na váčcích podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e konstrukční kroky způsobů a), b), c), d), e), h) a i) se provádějí homologní rekombinací mezi sekvencí o délce alespoň 30 nukleotidů na bakteriálním chromosomu a sekvencí o délce alespoň 30 nukleotidů na vektoru transformovaném do kmene.
4. Prostředek založený na váčcích podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e konstrukční kroky se provádějí homologními rekombinacemi typu dvojitého crossing-overu mezi dvěma sekvencemi o délce alespoň 30 nukleotidů na bakteriálním chromosomu oddělenými nukleotidovou sekvencí „X“, a dvěma sekvencemi o délce alespoň 30 nukleotidů na vektoru transformovaném do kmene oddělenými nukleotidovou sekvencí „Y“, kde při rekombinaci se zamění sekvence X a Y.

5. Prostředek založený na váčcích podle nároku 4, vyznačující se tím, že dvě nukleotidové sekvence mají přibližně stejnou délku, a kde vektorem je lineární molekula DNA.
6. Prostředek založený na váčcích podle nároku 4 nebo 5, vyznačující se tím, že rekombinace ve způsobech a), b), c), d), e) a h) se provádějí v oblasti chromosomu ve vzdálenosti 1000 bp proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu sledovaného genu.
7. Prostředek založený na váčcích podle nároku 6, vyznačující se tím, že u způsobů a), d) nebo h) obsahuje nukleotidová sekvence X část promotorové oblasti genu a nukleotidová sekvence Y obsahuje buď oblast slabého promotoru nebo promotorovou oblast neobsahuje.
8. Prostředek založený na váčcích podle nároku 6, vyznačující se tím, že u způsobů b) nebo e) obsahuje nukleotidová sekvence Y oblast silného promotoru pro bakterii.
9. Prostředek založený na váčcích podle nároku 8, vyznačující se tím, že nukleotidová sekvence Y je vložena ve vzdálenosti 200 až 600 bp proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu sledovaného genu.
10. Prostředek založený na váčcích podle nároku 9, vyznačující se tím, že nukleotidová sekvence Y

je vložena ve vzdálenosti přibližně 400 bp proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu sledovaného genu.

11. Prostředek založený na váčcích podle nároku 6, kde u způsobu c) obsahuje sekvence X část represivní řídicí sekvence promotoru, a nukleotidová sekvence Y takovou sekvenci neobsahuje.
12. Prostředek založený na váčcích podle nároku 4 nebo 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e rekombinace u způsobů a), d) a h) se provádějí tak, že nukleotidová sekvence X obsahuje část kódující sekvence sledovaného genu.
13. Prostředek založený na váčcích podle nároku 4 nebo 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e rekombinace u způsobu i) se provádějí tak, že nukleotidová sekvence Y obsahuje další kopii genu uvnitř expresní kazety.
14. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 1 až 13, izolovaný z modifikovaného kmene *Neisseria meningitidis* B.
15. Prostředek založený na váčcích podle nároku 14, získatelný použitím alespoň způsobu b) a/nebo i), kde regulace k zesílení exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny zahrnující NspA, gen podobný Hsf, Hap, PorA, PorB, OMP85, PilQ, PldA, FrpB, TbpA, TbpB, FrpA, FrpC, LbpA, LbpB, FhaB, HasR, lipo02, Tbp2 (lipo28), MltA (lipo 30) a ctrA.
16. Prostředek založený na váčcích podle nároku 14 nebo 15, získatelný použitím alespoň způsobu a), kde regulace ke snížení

exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny: PorA, PorB, PilC, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, Opa a Opc.

17. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 14 až 16, získatelný použitím alespoň způsobu d), kde regulace ke snížení exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny: htrB, msbB a lpxK.
18. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 14 až 17, získatelný použitím alespoň způsobu e), kde regulace ke zvýšení exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny: pmrA, pmrB, pmrE a pmrF.
19. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 14 až 18, získatelný použitím alespoň způsobu c), kde represivní řídicí sekvence promotoru je operátorová oblast *fur* jednoho nebo obou genů TbpB nebo LbpB.
20. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 14 až 19, získatelný použitím alespoň způsobu h), kde regulace ke snížení exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny: galE, siaA, siaB, siaC, siaD, ctrA, strB, ctrC a ctrD.
21. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 1 až 13, izolovaný z modifikovaného kmene *Moraxella catarrhalis*.
22. Prostředek založený na váčcích podle nároku 21, získatelný použitím alespoň způsobu b) a/nebo i), kde regulace ke zvýšení exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny

zahrnující: OMP106, HasR, PilQ, OMP85, lipo06, lipo10, lipo11, lipo18, P6, ompCD, CopB, D15, Omp1A1, Hly3, LbpA, LbpB, TbpA, TbpB, OmpE, UspA1, UspA2 a Omp21.

23. Prostředek založený na váčcích podle nároku 21 nebo 22, získatelný použitím alespoň způsobu a), kde regulace ke snížení exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny: CopB, OMP106, OmpB1, TbpA, TbpB, LbpA a LbpB.
24. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 21 až 23, získatelný použitím alespoň způsobu d), kde regulace ke snížení exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny: htrB, msbB a lpxK.
25. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 21 až 24, získatelný použitím alespoň způsobu e), kde regulace ke zvýšení exprese probíhá u jednoho nebo více genů zvolených ze skupiny pmrA, pmrB, pmrE a pmrF.
26. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 1 až 13, izolovaný z modifikovaného kmene *Haemophilus influenzae*.
27. Prostředek založený na váčcích podle nároku 26, získatelný použitím alespoň jednoho způsobu b) a/nebo i), kde je ke zvýšení exprese regulován jeden nebo více genů ze skupiny D15, P6, TbpA, TbpB, P2, P5, OMP26, HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, His, Hsf, Hap, Hin47 a Hif.

28. Prostředek založený na váčcích podle nároku 26 nebo 27, získatelný použitím alespoň způsobu a), kde ke snížení exprese je regulován jeden nebo více genů ze skupiny P2, P5, Hif, IgA1-proteáza, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, TbpA a TbpB.
29. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 26 až 28, získatelný použitím alespoň způsobu d), kde ke snížení exprese je regulován jeden nebo více genů ze skupiny htrB, msbB a lpxK.
30. Prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 26 až 29, získatelný použitím alespoň způsobu e), kde ke zvýšení exprese je regulován jeden nebo více genů ze skupiny pmrA, pmrB, pmrE a pmrF.
31. Prostředek založený na geneticky zkonstruovaných váčcích ze kmene gramnegativních bakterií, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e tento prostředek je získatelný použitím způsobu zahrnujícího následující kroky: zavedení heterologního genu popřípadě řízeného silnou promotorovou sekvencí do chromosomu homologní rekombinací a vytvoření váčků z uvedeného kmene.
32. Prostředek založený na váčcích podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e gramnegativní kmen je *Neisseria gonorrhoeae* a heterologní gen je ochranný OMP z *C. trachomatis*.

33. Prostředek založený na váčcích podle nároku 31, vyznačující se tím, že gramnegativní kmen je *Haemophilus influenzae* a heterologní gen je ochranný OMP z *Moraxella catarrhalis*.
34. Prostředek založený na váčcích podle nároku 31, vyznačující se tím, že gramnegativní kmen je *Moraxella catarrhalis* a heterologní gen je ochranný OMP z *Haemophilus influenzae*.
35. Vakcína, vyznačující se tím, že obsahuje prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 1 až 34, a farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.
36. Vakcína proti meningokokům, vyznačující se tím, že obsahuje prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 14 až 20, a jeden nebo více prostých nebo konjugovaných obalových polysacharidů meningokoků, zvolených ze sérotypů A, C, Y nebo W.
37. Vakcína proti meningitidě, vyznačující se tím, že obsahuje prostředek podle některého z nároků 14 až 20, nebo prostředek založený na váčcích podle nároku 32, konjugovaný obalový polysacharid *H. influenzae* b a jeden nebo více prostých nebo konjugovaných obalových polysacharidů pneumokoků.
38. Vakcína proti zánětu středního ucha, vyznačující se tím, že obsahuje prostředek založený na váčcích podle

některého z nároků 21 až 25, a jeden nebo více prostých nebo konjugovaných obalových polysacharidů pneumokoků, a jeden nebo více antigenů, které mohou hostitele chránit proti infekci netypovatelným *H. influenzae*.

39. Vakcína proti zánětu středního ucha, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 26 až 30, a jeden nebo více prostých nebo konjugovaných obalových polysacharidů pneumokoků, a jeden nebo více antigenů, které mohou chránit hostitele proti infekci *Moraxella catarrhalis*.
40. Vakcína proti zánětu středního ucha podle nároku 38 nebo 39, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e vakcína navíc obsahuje jeden nebo více proteinových antigenů, které mohou hostitele chránit proti *Streptococcus pneumoniae*, a/nebo jeden nebo více antigenů, které mohou hostitele chránit proti RSV, a/nebo jeden nebo více antigenů, které mohou hostitele chránit proti viru chřipky.
41. Vektor vhodný pro provádění rekombinací popsaných v nárocích 3 až 34.
42. Modifikovaný kmen gramnegativní bakterie, ze kterého se připravuje prostředek založený na váčcích podle některého z nároků 1 až 34.

43. Imunoprotektivní a netoxická vakcína založená na gramnegativních váčcích, prázdných buňkách nebo usmrčených celých buňkách, vhodná pro pediatrické použití.
44. Izolovaná polynukleotidová sekvence, která hybridizuje za vysoce stringentních podmínek s částí nukleotidů, uvedených v SEQ ID No. 2 až 23, 25, 27 až 81, o délce alespoň 30 nukleotidů, nebo jejím komplementárním řetězcem.
45. Izolovaná polynukleotidová sekvence podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje alespoň 30 nukleotidů.
46. Izolovaná polynukleotidová sekvence podle nároku 45, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje alespoň 30 nukleotidů SEQ ID No. 2 až 23, 25, 27 až 81, nebo její komplementární řetězec.
47. Použití izolované polynukleotidové sekvence podle některého z nároků 44 až 46 při provádění homologní rekombinace ve vzdálenosti do 1000 bp proti směru transkripce chromosomálního genu gramnegativní bakterie buď pro zvýšení nebo snížení exprese uvedeného genu.
48. Způsob genetické regulace ke zvýšení exprese genu ve kmeni gramnegativních bakterií, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje následující kroky: připraví se vektor obsahující sekvenci silného promotoru a nukleotidovou sekvenci o délce alespoň 30 nukleotidů, která je schopná rekombinace se sekvencí

o délce alespoň 30 nukleotidů ve vzdálenosti 1000 bp proti směru transkripce genu, bakteriální kmen se transformuje tímto vektorem a provede se homologní rekombinace mezi chromosomem a vektorem pro zavedení promotoru ve vzdálenosti do 1000 bp proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu genu.

49. Způsob podle nároku 48, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e promotor se zavádí do vzdálenosti 200 až 600 bp proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu genu.
50. Způsob podle nároku 49, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e promotor se zavádí přibližně 400 bp proti směru transkripce vzhledem k iniciačnímu kodonu genu.
51. Způsob podle některého z nároků 48 až 50, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e homologní rekombinace se provádí pomocí procesu dvojitého crossing-overu mezi dvěma sekvencemi o délce alespoň 30 nukleotidů na bakteriálním chromosomu, oddělenými nukleotidovou sekvencí „X“, a dvěma sekvencemi o délce alespoň 30 nukleotidů na vektoru, oddělenými nukleotidovou sekvencí „Y“, která obsahuje sekvenci silného promotoru, kde vektorem je lineární nukleotidová sekvence, a kde v průběhu rekombinace se zamění X a Y.
52. Způsob podle nároku 51, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e dvě nukleotidové sekvence mají přibližně stejnou délku.

53. Modifikovaný bakteriální kmen získatelný způsobem podle některého z nároků 48 až 52.

54. Způsob výroby prostředku založeného na geneticky zkonstruovaných váčcích z kmene gramnegativních bakterií, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e s e použije jeden nebo více způsobů zvolených z následující skupiny:

- a) způsob omezení imunodominantních variabilních nebo neprotektivních antigenů v prostředku založeném na váčcích, kde tento způsob zahrnuje kroky zjištění identity takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene pro produkci menšího množství nebo žádného uvedeného antigenu a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- b) způsob regulace ke zvýšení exprese ochranných antigenů OMP v prostředku založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene pro zavedení silnější promotorové sekvence proti směru transkripce vzhledem ke genu kódujícímu uvedený antigen tak, že tento gen je exprimován ve vyšší míře než v nemodifikovaném váčku, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- c) způsob regulace ke zvýšení exprese podmíněně exprimovaných, ochranných antigenů OMP v prostředku založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby se odstranily represivní řídicí mechanismy jeho exprese, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- d) způsob modifikace podílu lipidu A v bakteriálním LPS v prostředku založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace genu, který má účast při učinění části lipidu A

LPS toxickou, zkonstruování bakteriálního kmene pro snížení nebo vypnutí exprese tohoto genu, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;

- e) způsob modifikace podílu lipidu A v bakteriálním LPS v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace genu, který má účast při učinění části lipidu A LPS méně toxickou, zkonstruování bakteriálního kmene pro zavedení silnější promotorové sekvence proti směru transkripce uvedeného genu tak, že tento gen je exprimován s vyšší mírou než v nemodifikovaných váčcích, a vytvoření váčků z tohoto kmene;
- f) způsob snížení toxicity lipidu A v prostředí založeném na váčcích a zvýšení hladin ochranných antigenů, který zahrnuje kroky zkonstruování chromosomu bakteriálního kmene pro zavedení genu kódujícího peptid polymyxin A, nebo jeho derivát nebo analog, fúzovaného k ochrannému antigenu, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- g) způsob vytvoření konzervovaných antigenů OMP v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby byly odstraněny variabilní oblasti genu kódujícího uvedený antigen, a vytvoření váčků z uvedeného kmene;
- h) způsob snížení exprese antigenu v prostředí založeném na váčcích, kde tento antigen sdílí strukturní podobnost s lidskou strukturou a může být schopný indukovat autoimunitní odpověď u lidí, který zahrnuje kroky identifikace genu, který se účastní biosyntézy antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby se snížila nebo vypnula exprese uvedeného kmene, a vytvoření váčků z uvedeného kmene; nebo

- i) způsob regulace ke zvýšení exprese ochranných antigenů OMP v prostředí založeném na váčcích, který zahrnuje kroky identifikace takového antigenu, zkonstruování bakteriálního kmene tak, aby se do chromosomu zavedla jedna nebo více dalších kopií genu kódujícího uvedený antigen, řízeného heterologní, silnější promotorovou sekvencí, a vytvoření váčků z uvedeného kmene.

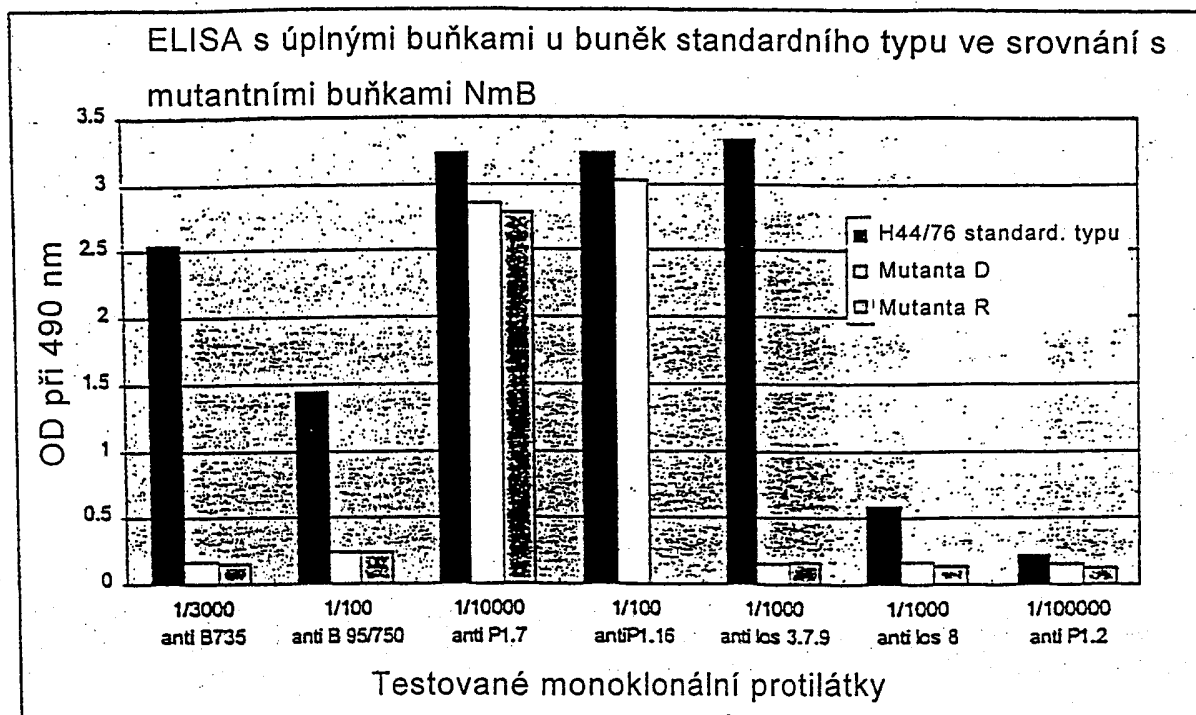
55. Způsob imunizace lidského hostitele proti onemocnění způsobenému infekcí jedním nebo více druhy zvolenými z následující skupiny: *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumonia*, kde tento způsob zahrnuje podávání imunoprotektivní dávky prostředí založeného na váčcích podle některého z nároků 1 až 34 hostiteli.

56. Použití prostředí založeného na váčcích podle některého z nároků 1 až 34 při výrobě farmaceutického prostředí pro imunizaci lidského hostitele proti onemocnění způsobenému infekcí jedním nebo více z následujících druhů: *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumonia*.

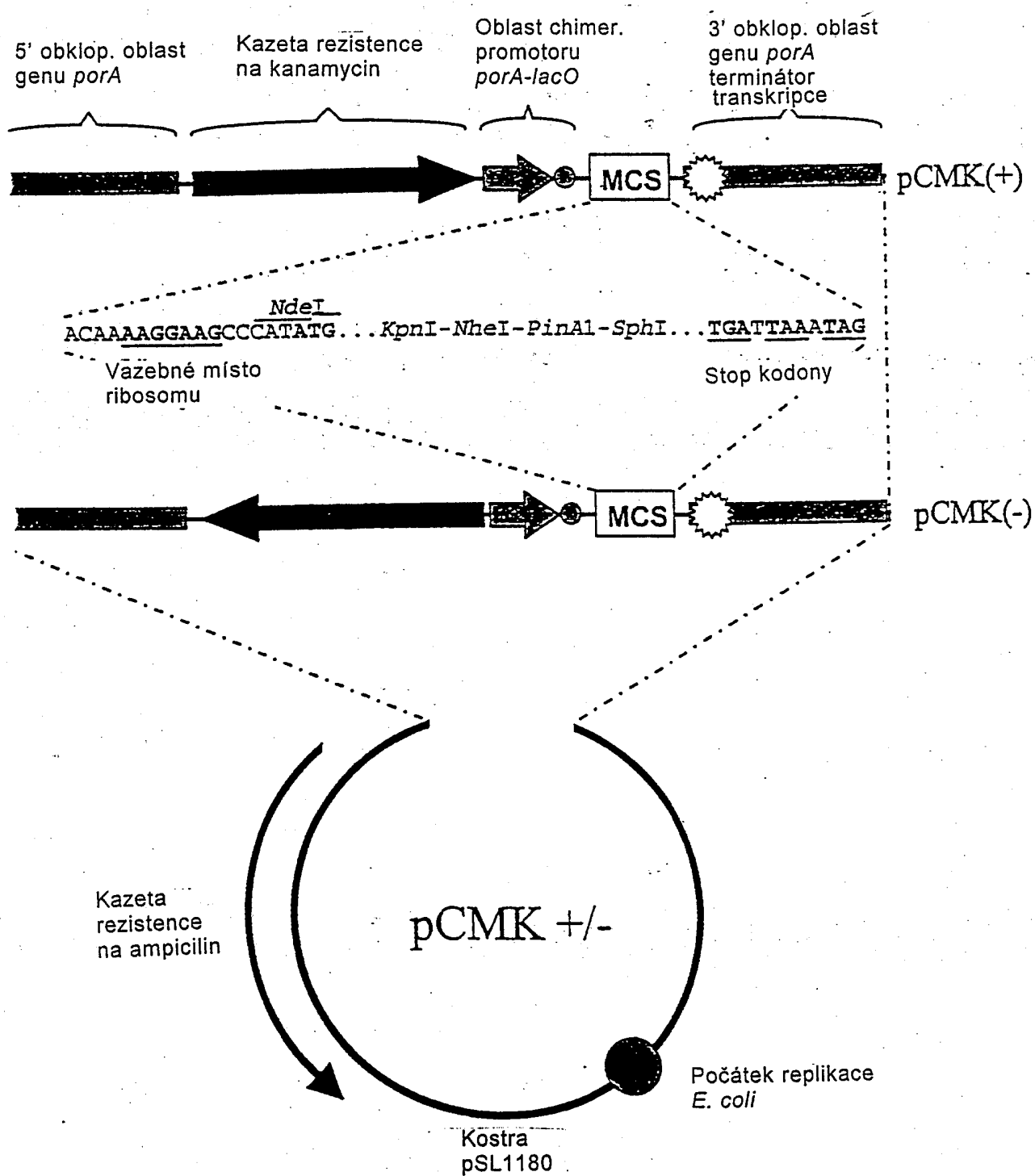
Zastupuje:

~~12721~~

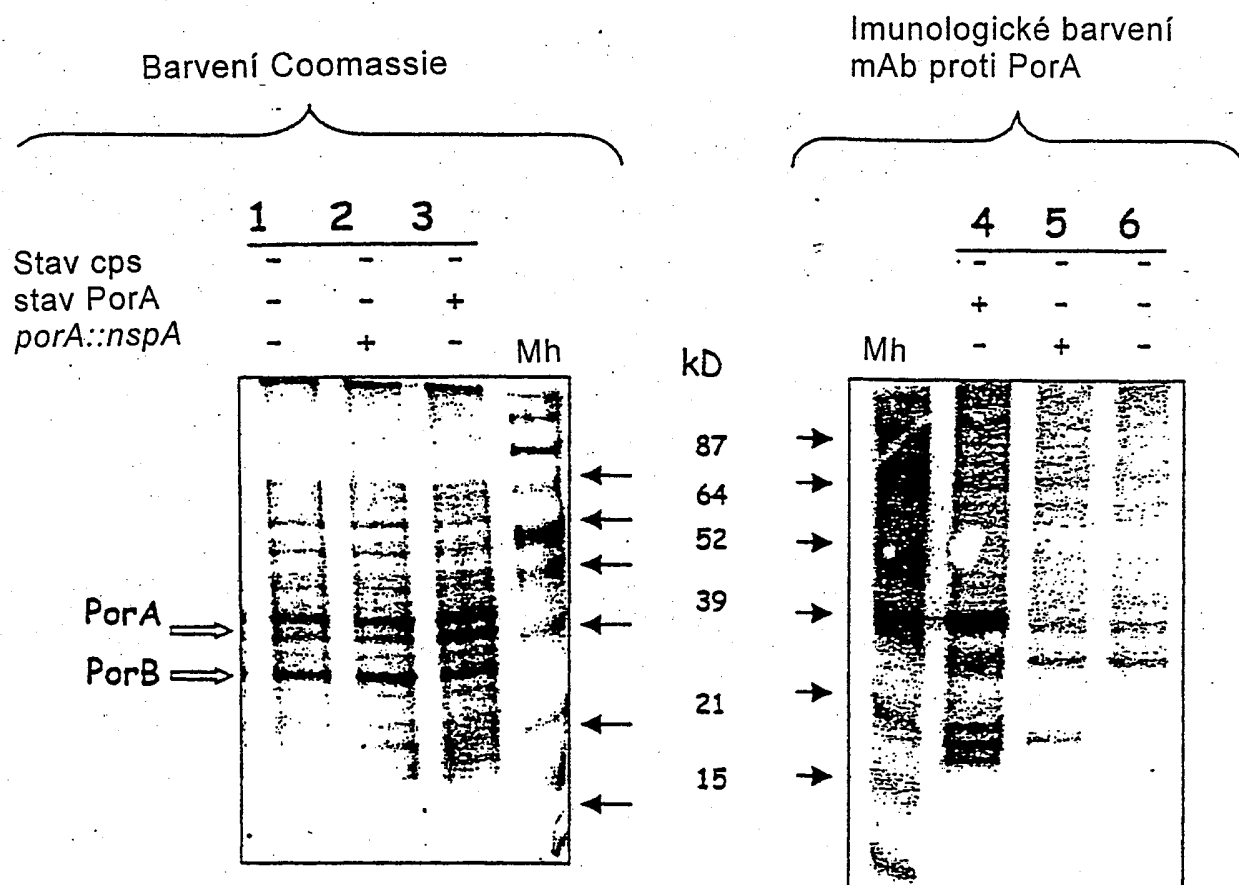
Obr. 2



Obr. 3



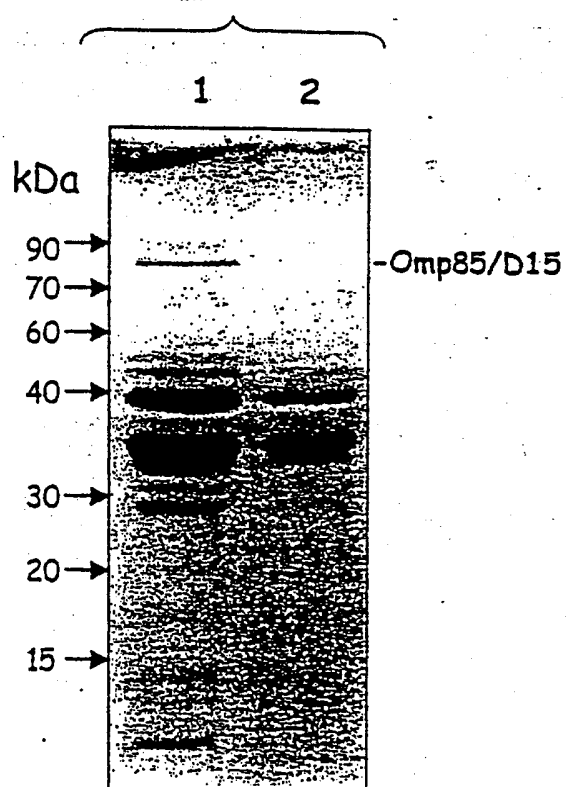
Obr. 4



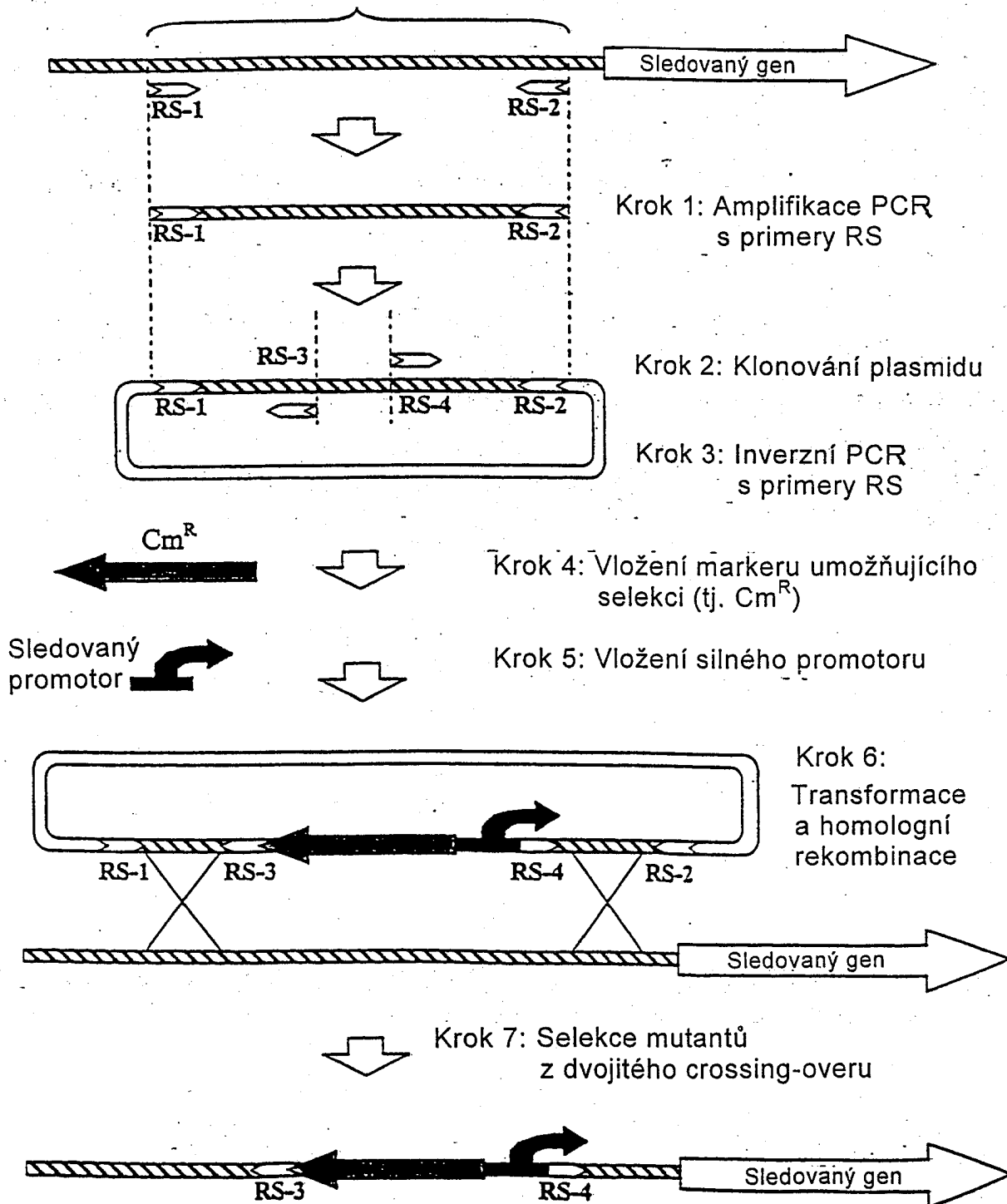


Obr. 6

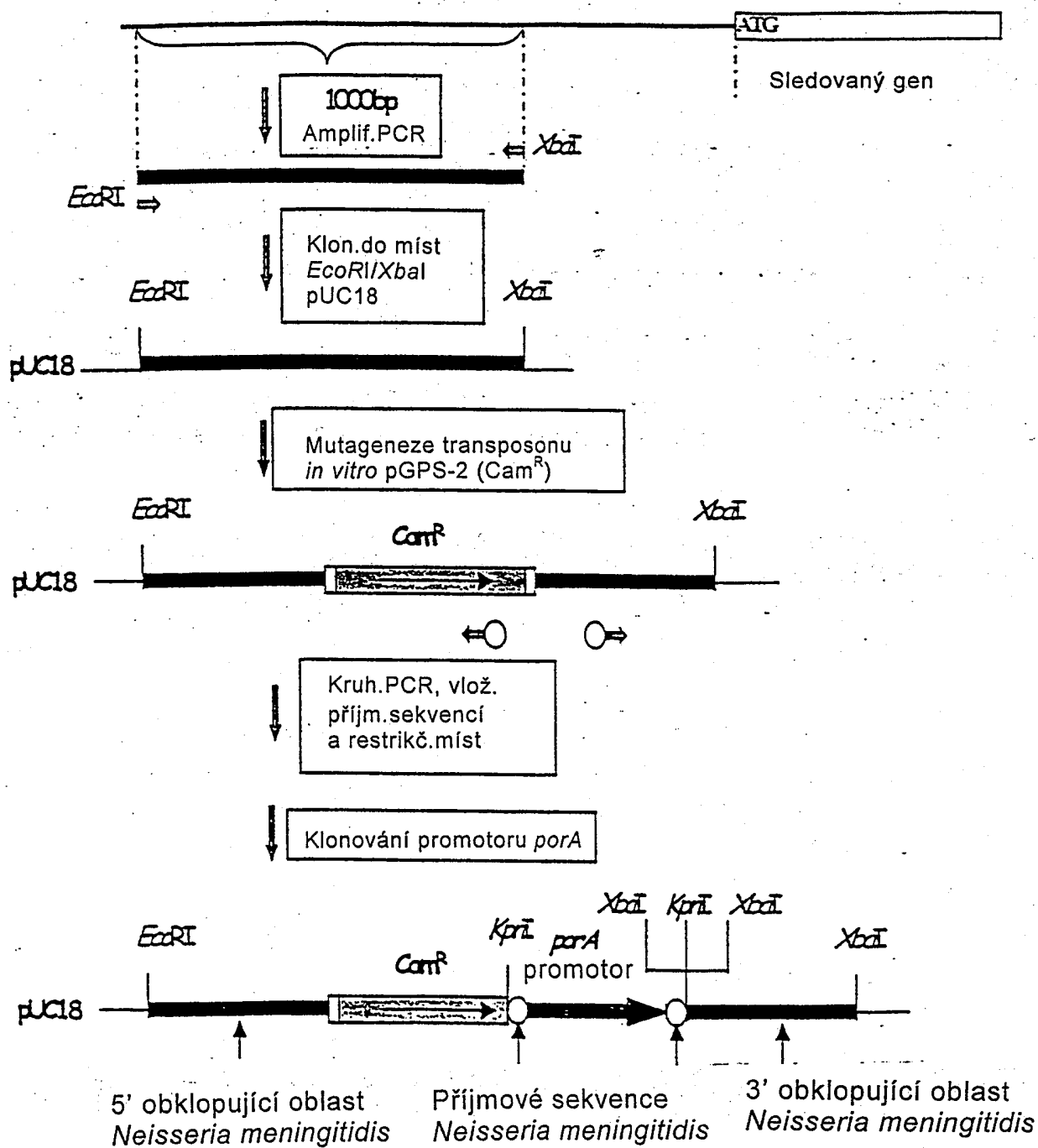
Barvení Coomassie



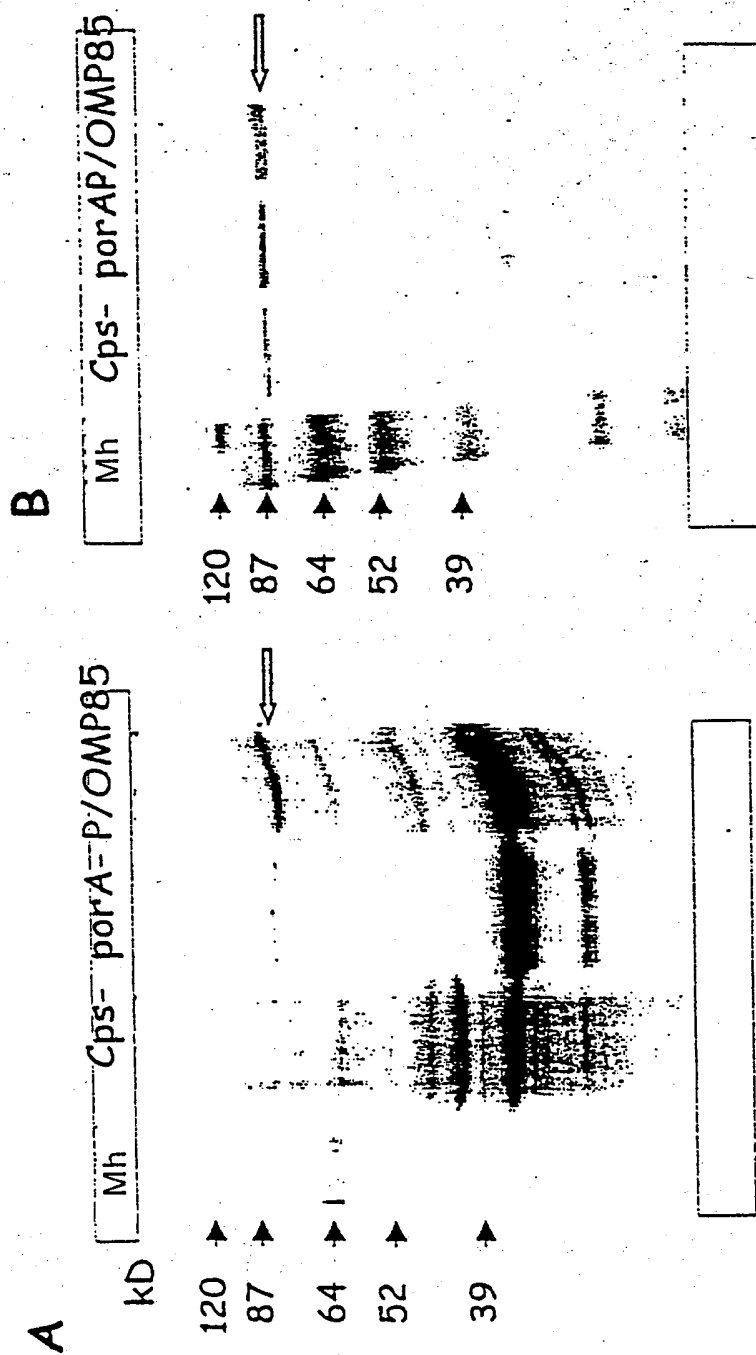
Obr. 7

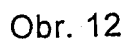


Obr. 9

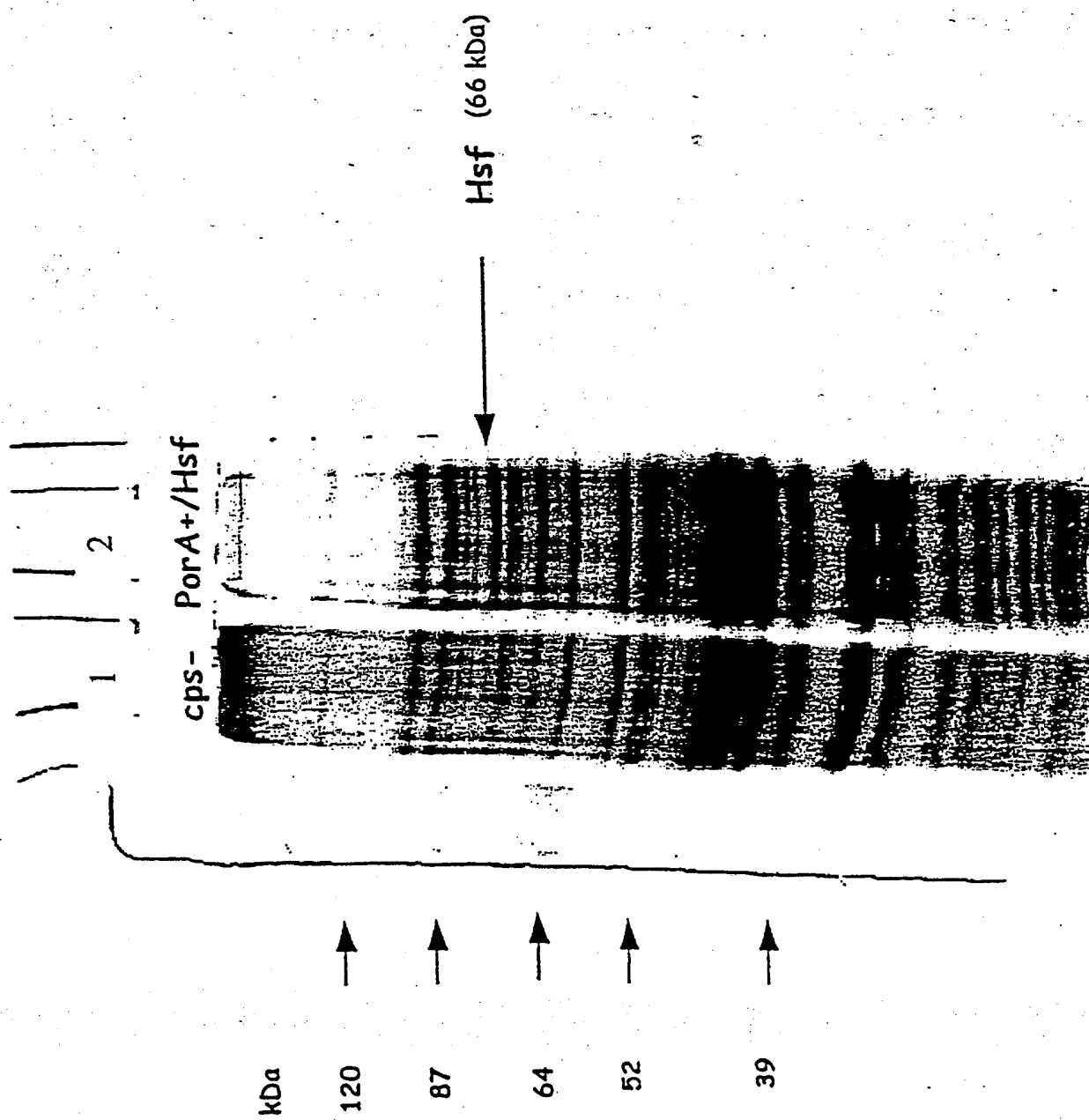


Obr. 11

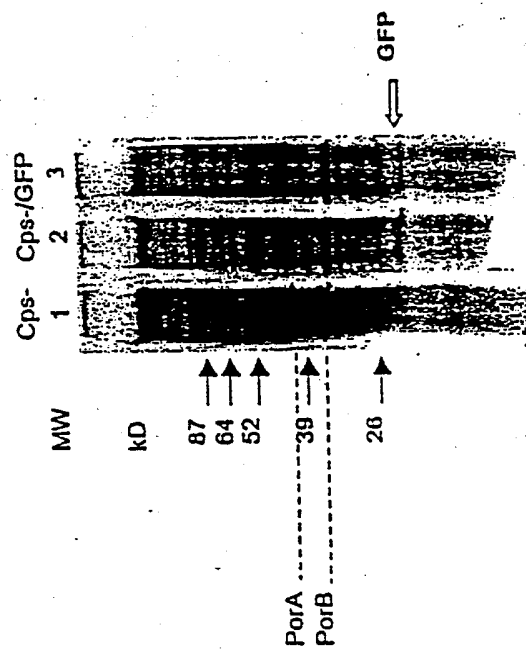




Obr. 13

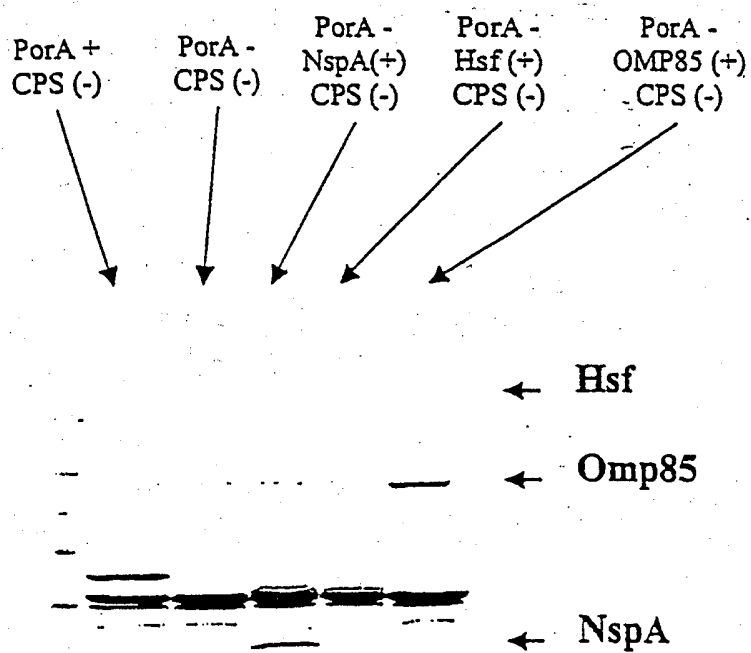


Obr. 14

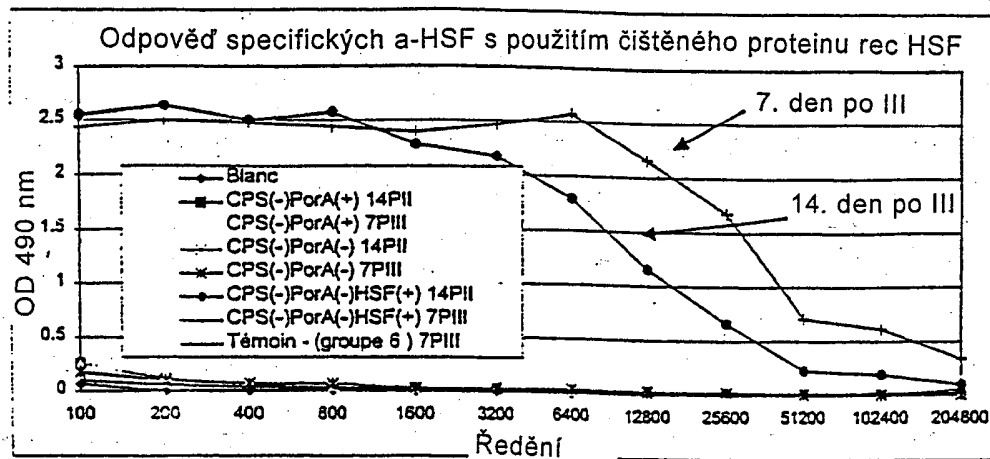


Obr. 15

SDS Page 1



Obr. 16



Obr. 17

