



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 181**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97936881 .8**

86 Fecha de presentación : **21.08.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0991761**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2000**

54

Título: **Mutantes nuevos de bacterias mucosas gram negativas y su aplicación en vacunas.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73

Titular/es: **DE STAAT DER NEDERLANDEN
VERTEGENWOORDIGD DOOR DE MINISTER VAN
WELZIJN, VOLKSGEZONDHEID EN CULTUUR
P.O. Box 5406
NL-2280 HK Rijswijk, NL**

72

Inventor/es: **Van der Ley, Peter, André y
Steeghs, Liana, Juliana, Josephine, Margret**

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 301 181 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutantes nuevos de bacterias mucosas gram negativas y su aplicación en vacunas.

5 **Resumen de la invención**

10 Hemos descubierto que a diferencia de las conclusiones precedentes referentes a *E. coli* es posible inactivar la fase temprana de una síntesis de lípido A de bacterias mucosas Gram negativas sin comprometer la viabilidad de la célula. En particular, el gen *IpxA* en *Neisseria meningitidis* mutó sin comprometer la viabilidad de la célula. Se descubrió que los mutantes con genes hechos inoperativos *IpxA* resultantes eran completamente deficientes en LPS. Se detectaron las principales proteínas de la membrana externa (OMP) en cantidades normales. Se podría distinguir también una membrana externa en micrográficos de electrones de secciones ultrafinas. Para nuestro conocimiento, este fue el primer ejemplo de un mutante bacteriano viable Gram negativo completamente carente de LPS.

15 El resultado proporciona implicaciones importantes a nuestro entender en cuanto a estructura y biogénesis de la membrana externa. En un nivel práctico, la disponibilidad de mutantes deficientes en LPS de bacterias patógenas mucosas tales como *N. meningitidis* abre nuevas posibilidades para el desarrollo de vacunas. Esto permite el aislamiento fácil de proteínas purificadas sin endotoxinas, membranas externas o incluso preparaciones de células enteras para el uso en la inmunización.

20 **Información sobre los antecedentes**

25 El lipopolisacárido (LPS) constituye la monocapa externa de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Como tal forma un componente importante de la membrana externa y ha sido considerado relevante para la vacunación (Verheul *et al.*, 1993). La parte del lípido A sujeta a la membrana es responsable de la bien conocida actividad de la endotoxina de la molécula (Zähringer *et al.*, 1994).

30 Tal actividad de la endotoxina no es deseable en las vacunas. Habitualmente algunas preparaciones destinadas a ser usadas en vacunas son sometidas a procedimientos de purificación rigurosos y costosos en tiempo y en dinero para eliminar esta actividad de la endotoxina antes de que sean adecuadas para el uso como vacuna. Esto permite mayores conclusiones debido a la menor toxicidad. No obstante, los métodos de purificación drástica pueden conducir fácilmente a la desnaturalización de antígenos de proteína que necesitan retener su conformación nativa para producir una respuesta inmunitaria apropiada. Hasta la fecha están disponibles las vacunas polisacáridas del grupo A y C que han resultado sustancialmente libres de lipopolisacáridos mediante purificación. Hasta la fecha, no obstante, no se han producido vacunas de célula completa sustancialmente libres de LPS ni vacunas de OMP sustancialmente libres de LPS. Las siguientes referencias proporcionan detalles de procesos usados hasta la fecha para evitar LPS en productos farmacéuticos Akers (1985), Gabler (1987) y la Farmacopea Europea, segunda edición "test for non-pyrogenicity". Específicamente WHO Tech. Rep. Ser 594:50 1976 trata de los requisitos para una vacuna meningocócica polisacárida.

40 Los mutantes con defectos en la biosíntesis de LPS han sido descritos para muchas especies bacterianas, no obstante, ninguno de estos ha sido considerado candidato para una vacuna libre del lípido A endotóxico. Todos los mutantes viables retienen una cantidad mínima de lípido A - estructura KDO, que es la primera parte que debe ser sintetizada (Raetz, 1990) en la síntesis de LPS. Así, no servirían para superar el problema arriba mencionado al que se enfrentan los fabricantes de vacunas. Sobre todo, sólo se han proporcionado mutaciones condicionalmente letales para genes implicados en las fases tempranas de biosíntesis de lípido A en *Escherichia coli* (Raetz 1990). Estos mutantes tienen una mutación en los genes implicados en las fases tempranas de la biosíntesis del lípido A. Este descubrimiento sugirió que esta parte de la molécula LPS es de hecho esencial para el crecimiento bacteriano. Como tal, este resultado sería considerado disuasorio para personas expertas en la técnica de producción de vacunas de genes mutantes asociados con esto, puesto que el mutante resultante no crecería.

50 Se ha descubierto también que los inhibidores de la biosíntesis del lípido A conducen a una pérdida rápida de viabilidad celular en *E. coli* y varias otras bacterias (Onishi *et al.*, 1996) apoyando así la hipótesis arriba mencionada, en lo que se refiere a la naturaleza esencial de la biosíntesis del lípido A.

55 Además, han sido propuestos modelos para la biogénesis de las OMP, en los que el pliegue y objetivo correcto depende de LPS (Sen y Nikaido, 1991. Reid. *et al.*, 1990. Laird *et al.*, 1994. de Cock y Tommassen, 1996).

60 WO 97/25061 expone mutantes de bacterias Gram negativas que tienen forma de LPS deficitario en niveles de fracción de ácido mirístico, donde el gen *IpxF* es inhibido.

WO 97/19688 describe mutantes de bacterias Gram negativas que producen LPS menos tóxico como resultado de una mutación en el gen *htrB*.

65 Previamente clonamos el gen *IpxA* de *Neisseria meningitidis*, que codifica la enzima UDP-GlcNAc aciltransferasa requerida para el primer paso en la biosíntesis del lípido A (Steeghs *et al.* 1997). Intentando alterar la especificidad del ácido graso de esta enzima para construir un gen *IpxA* híbrido de *E. coli-N. meningitidis*, dimos con el descubrimiento inesperado que forma la base de la invención expuesta.

Descripción detallada de la invención

El aislamiento del gen *IpxA* de *N. meningitidis* implicado en la biosíntesis del lípido A ha sido proporcionado recientemente (Steeghs *et al.*, 1997). La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína LpxA mostró homología con la aciltransferasa de *E. coli* responsable de la adición de la cadena de miristoil 3-OH 0-enlazado a UDP-N-acetilglucosamina, que es el primer cometido en la vía biosintética del lípido A (Anderson and Raetz, 1987; Coleman and Raetz, 1988). Con base en esta homología y una comparación de las estructuras del lípido A de *N. meningitidis* y de *E. coli*, se espera que el gen *IpxA* meningocócico codifique una aciltransferasa con una especificidad de 3-OH-lauroil (Kulshin *et al.*, 1992). La base de la especificidad de ácido graso diferente puede estar localizada concebiblemente en el motivo de repetición del hexapéptido característico de estas aciltransferasas, que se ha determinado juega un papel crucial en el pliegue de la proteína de *E. coli* (Vuorio *et al.*, 1994. Raetz and Roderick, 1995). En un intento para verificar esta hipótesis hemos construido un gen *IpxA* híbrido, donde el dominio de la hélice β del N-terminal meningocócico que contiene el motivo de repetición hexapéptido fue sustituido por la parte correspondiente de *IpxA* de *E. coli*, seguido de transformación y sustitución alélica de este constructo por *N. meningitidis* H44/76. Los datos experimentales para este se proveen en los ejemplos (en particular el ejemplo 1).

Los resultados demostraron que la cepa H44/76[pHBK30] es un mutante viable deficiente en LPS. La explicación más probable para este descubrimiento sorprendente parecía ser que el gen *IpxA* híbrido se había transformado en inactivo, bien por transcripción/traducción interrumpida en nuestro constructo, o bien porque la proteína híbrida, como se había expresado, hubiera perdido su actividad enzimática. Para discernirlo, hemos construido un mutante *IpxA* de separación. Los resultados demostraron una vez más que el bloqueo de la vía de biosíntesis del lípido A en la cepa H44/76 de *N. meningitidis* conduce a mutantes viables deficientes en LPS.

Este es el primer informe de un mutante bacteriano viable Gram negativo completamente deficitario en LPS. Esto implica lo siguiente:

- (1) Sorprendentemente (en vista de lo anteriormente mencionado de la naturaleza esencial de la biosíntesis del lípido A para la viabilidad celular), es posible que algunas bacterias Gram negativas formen una membrana externa sin ningún residuo LPS que permanezca viable. Aunque nuestros resultados no excluyen una implicación de LPS en el proceso de formación de OMP, demuestran que obviamente no puede ser esencial. Sería muy interesante estudiar la estructura de la membrana externa en el mutante *IpxA* con más detalle,
- (2) En *E. coli*, todas las mutaciones que afectan a las fases tempranas de la biosíntesis del lípido A que han sido descritas, son letales cuando se expresan. El hecho de que este no sea el caso en los Meningococos, planteó la pregunta de qué organismo es típico en este aspecto, y qué causa esta diferencia. Es posible que esté relacionado con una interacción OMP-LPS diferente, que también ha sido sugerida por la observación de que mientras que los mutantes LPS muy toscos de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* muestran una expresión reducida de los OMPs más importantes (Koplow y Goldfine. 1974. Ames *et al.*, 1974), se encontró un mutante *rfaC* de *N. meningitidis* comparable deficitario en heptosa, que tenía porinas de la clase 1 y 3 de expresión normal (Hamstra and van der Ley, inédito).

Nosotros postulamos que las bacterias Gram negativas mucosas pueden ser mutadas de una manera análoga liberándolas de LPS endotóxico, permitiendo posteriormente el desarrollo de células completas libres de LPS o vacunas acelulares tales como vacunas OMP. La base para esta postulación se encuentra en el conocimiento disponible para el experto en la materia en lo que se refiere a la biosíntesis del lípido A en bacterias mucosas Gram negativas. La figura 6 p. ej. derivada de Raetz 1990 proporciona un diagrama de las fases tempranas en la biosíntesis del lípido A. Revela el requisito de *IpxA* y *IpxB* como enzimas requeridas en la biosíntesis temprana. La enzima *IpxD* es también conocida por estar implicada (Steeghs *et al* 1997). El experto en la materia conocerá las secuencias de ácidos nucleicos que codifican estos genes (Steeghs *et al* 1997). Posteriormente es posible la mutación de uno o más de los genes que codifican las enzimas implicadas en los estadios tempranos de la biosíntesis del Lípido A. La figura 6 muestra los estadios tempranos; preferiblemente la mutación surgirá de manera que no se alcance ningún estadio que liderara en el pasado el estadio *IpxB*, puesto que estos productos ya se asemejan mucho a la estructura de un lípido A. Preferiblemente la mutación surgirá lo más pronto posible en la vía de la biosíntesis. En la mayoría de los casos los genes que codifican *IpxA*, *IpxB* y *IpxD* son reagrupados. Steeghs *et al* proporciona referencias que revelan detalles de este tipo para *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Haemophilus influenzae* y *Rickettsia rickettsii*. El experto en la materia conocerá las secuencias de estos microorganismos y se pueden encontrar secuencias homólogas en otros organismos. Tanto *IpxA* como *IpxD* contienen una estructura de repetición hexapéptida característica [(I.V.L)GXXXX]_n. El gen *IpxB* generalmente se cotranscribe con *IpxA* y puede también ser fácilmente encontrado como tal. El grupo también comprende el gen *fabZ* que también puede ser usado para determinar la ubicación del grupo de genes implicado en la biosíntesis del lípido A (Steeghs *et. al* 1997). Steeghs *et al* proporcionan el número de bancos de genes bajo el que están disponibles los datos de la secuencia de *N. meningitidis* en lo que se refiere al grupo de genes de la biosíntesis del lípido A, es decir U79481.

Hay dos posibilidades para mutar uno o más genes asociados a la biosíntesis del Lípido A. La mutación de este tipo puede ser de tal manera que la enzima sea producida de una forma inactiva o de manera que el gen sea mutado de forma que no se exprese, es decir, formando un así llamado mutante knockout. Las

ES 2 301 181 T3

maneras en las que este objetivo puede ser conseguido son numerosas y estarán fácilmente disponibles para un experto en la técnica de la ingeniería genética. Evidentemente a modo de ejemplo se puede usar el procedimiento análogo a aquel empleado en los ejemplos para diferentes microorganismos y/o diferentes enzimas conocidas por estar implicadas en los estadios tempranos de la biosíntesis del lípido A. La característica principal de la preparación de mutantes knockout es bien conocida y puede ser aplicada a cualquiera de las enzimas de codificación de genes activos en los estadios tempranos de la biosíntesis del lípido A. La invención expuesta comprende los mutantes anteriormente descritos. Además, comprende vacunas nuevas hechas de organismos de este tipo o partes componentes de los mismos. Las vacunas de este tipo nuevo están libres de lípido A. Las vacunas de este tipo pueden de hecho estar completamente libres tanto de lípido activo como de lípido inactivo A. Como consecuencia, las vacunas están libres de LPS. La prueba del *Limulus* puede ser aplicada, como se describe en este caso, para determinar que una preparación está efectivamente libre de LPS. Así, una vacuna contra una bacteria mucosa Gram negativa, estando dicha vacuna sustancialmente libre de LPS, donde que esté sustancialmente libre puede ser determinado por la prueba del *Limulus*, comprendiendo dicha vacuna un microorganismo según la invención, como se ha descrito arriba, como componente activo está incluida en el campo de la invención. Esta es una vacuna denominada de célula completa. Además, una vacuna contra una bacteria mucosa Gram negativa que comprende uno o más componentes del microorganismo arriba mencionado, que está también sustancialmente libre de LPS, tal y como se ha definido anteriormente, está cubierta por la invención. En particular, una vacuna comprendiendo OMP sustancialmente libre de LPS, tal como se ha definido anteriormente, está cubierta por la invención.

Un método para producir una vacuna contra una bacteria mucosa Gram negativa utilizando un microorganismo según la invención y/o partes derivadas como componente activo en una manera conocida *per se* para producir vacunas de célula completa o acelulares está cubierto por la invención, puesto que son los productos de dicho método. Las vacunas según la invención estarán además caracterizadas preferiblemente por la presencia de un adyuvante para potenciar la actividad inmunogénica de las mismas. Son conocidos varios adyuvantes comúnmente usados en vacunas. Cualquiera de estos puede ser aplicado de manera adecuada.

Cualquier forma de dosificación y componentes adicionales usados comúnmente en las vacunas, en particular vacunas meningocócicas, son convenientes para la presente invención.

Los microorganismos objetivo particularmente adecuados son diplococos y *Bordetella pertussis*. Los diplococos comprenden meningococos y gonococos. Los ejemplos de cada categoría son *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Muchos otros organismos que se encuentran dentro de esta categoría son conocidos del manual Bergeys de *Determinative Bacteriology*. Estos diplococos están estructuralmente muy relacionados y muestran la misma estructura de gen. Ambos son microorganismos interesantes desde el punto de vista de la vacunación, como lo son varios otros microorganismos, tal como *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

Obviamente se puede intentar la construcción de mutantes knockout *IpxA* en otras especies bacterianas conocidas por tener lípido A en su lipopolisacárido.

- (3) La disponibilidad de los mutantes deficientes en LPS permitirá procedimientos nuevos para el desarrollo de la vacuna contra *N. meningitidis* y el patógeno muy relacionado *N. gonorrhoeae*, al igual que cualquier otra bacteria, como se ha mencionado anteriormente, para las que dichos mutantes pueden ser hechos y aislados. Primero, se hará mucho más fácil purificar las OMP u otros componentes de superficie celular sin contaminar la endotoxina. En segundo lugar, el papel de los LPS en las vacunas de vesícula de la membrana externa meningocócica, p. ej. como adyuvante o estabilizante de la conformación de OMP (Verheul *et al.*, 1993. Nakano and Matsuura, 1995. Poolman, 1995), puede ahora ser inequívocamente determinado y posiblemente superado por un compuesto menos tóxico. En tercer lugar, puede investigarse el uso de vacunas de célula completa inactivada, usando mutantes sin endotoxina según la invención, tales como los mutantes de *IpxA*. Finalmente, la posibilidad de usar cepas deficientes en LPS, puesto que ahora surge la posibilidad de vacunas de vida atenuada.

La naturaleza exacta de la invención será adicionalmente esclarecida con los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Construcción de un gen inactivo *IpxA* en *N. meningitidis*

En dos reacciones PCR separadas la parte *E. coli* y *N. meningitidis* del gen híbrido fue amplificada con el cebador Epr1/Epr2 y Npr1/Npr2, respectivamente (fig. 1). Los cebadores internos Epr2 y Npr1 fueron diseñados de modo que las extremidades de los productos contuvieran secuencias complementarias. Estos productos fueron mezclados, desnaturalizados y reanclados en una segunda PCR, donde el constructo fundido fue amplificado por los cebadores externos Epr1 y Npr2, que tienen un sitio *MluI* y *SpeI* respectivamente (fig. 1). El producto resultante de la PCR fue clonado y su secuencia verificada.

ES 2 301 181 T3

Para probar la actividad del híbrido *IpxA*, este gen fue usado para reemplazar el *IpxA* original en el cromosoma meningocócico (fig. 2). Para este propósito, el fragmento *MluI/SpeI* de 1,0 kb, que llevaba el gen *IpxA* de tipo salvaje en el plásmido pLA19 (un derivado de pUC18 con un inserto *IpxD-fabZ-IpxA* de 1,9 kb) fue sustituido por el gen híbrido *IpxA* digerido de forma similar. Posteriormente, un casete de resistencia de canamicina fue ligado en el sitio *MluI*, localizado directamente corriente arriba de *IpxA*, dando como resultado el plásmido pHBK30.

La transformación de *N. meningitidis* H44/76 con pHBK30 linealizados dió colonias resistentes a la canamicina después de 24 horas de incubación. Estos mutantes murieron cuando fueron transferidos a placas CC frescas con canamicina (100 µg/ml).

Reduciendo la concentración de canamicina y seleccionando las colonias resultantes por amplificación PCR de los fragmentos específicos del híbrido *IpxA*, conseguimos finalmente el aislamiento de los transformantes viables *kanRo*H44/76[pHBK30], donde el gen *IpxA* cromosómico había sido sustituido por el constructo híbrido, como se muestra en la figura 2.

El LPS del mutante H44/76[pHBK30] y de la cepa de tipo salvaje fue comparado por Tricina-SDS-PAGE seguido de una coloración de plata de los carbohidratos (fig. 3). Sorprendentemente, no se pudo detectar ningún LPS en el derivado híbrido por este método, incluso cuando fueron cargadas cantidades más altas de lisatos de célula en el gel.

Para comprender mejor la estructura de la membrana externa H44/76[pHBK30] fue evaluado un panel de mAbs específico de LPS y OMP en una célula ELISA completa (Tabla 1). La cepa mutante no se unió a ninguno de los mAbs específicos de LPS, mientras que los mAbs específicos de las OMP mostraron modelos de unión similares para el mutante y el tipo salvaje. Esta aparente similitud con OMP fue confirmada cuando las OMC de H44/76[pHBK30] y H44/76 fueron aisladas y analizadas por SDS-PAGE (fig. 3). Ambas cepas muestran las mismas cantidades de OMP de la clase 1, 3 y 4; a diferencia del tipo salvaje, el mutante claramente también expresa una OMP de clase 5.

Puesto que no se pudo detectar LPS de H44/76[pHBK30] con ninguno de los métodos anteriormente descritos, se hizo cuestionable si llegaba a estar presente. En consecuencia, la cepa mutante y de tipo salvaje fueron evaluadas en un ensayo de *Limulus* cromogénico (LAL), con un medio meningocócico como control negativo. Este ensayo depende de la activación de la cascada enzimática de coagulación en el lisado de amebocitos obtenido del cangrejo de herradura y es capaz de detectar cantidades en picogramos de endotoxina. Los resultados del ensayo LAL en suspensiones celulares no mostraron actividad significativa de endotoxina para H44/76[pHBK30] sobre un medio meningocócico (0,3 y 1,7 EU/ml, respectivamente), a diferencia de 21,7 X 10⁴ EU/ml para el tipo salvaje.

Tomados juntos, estos resultados demuestran que el intento inicial para reemplazar el gen *IpxA* de tipo salvaje con el constructo híbrido resultó en el aislamiento de lo que fue claramente un mutante deficiente en LPS. Esto fue además confirmado por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS), análisis de ácidos grasos presentes en las preparaciones OMC, que mostró que el 3-OH C12 específico del lípido A sólo estaba presente en cantidades de traza en el mutante. Como este ácido graso se añade en la primera fase de la biosíntesis del lípido A, su ausencia demuestra que el mutante es realmente deficitario en LPS y que no solamente forma alguna molécula precursora incompleta sin unión de anticuerpos ni actividad en el ensayo LAL.

Aunque H44/76[pHBK30] es completamente viable, se apreció una velocidad de crecimiento menor en comparación con la cepa de tipo salvaje. Cuando se dejó crecer durante toda la noche en placas de agar GC, la cepa mutante producía colonias mucho más pequeñas; en el medio líquido el tiempo duplicado durante el crecimiento exponencial fue aproximadamente un 50% superior a una cepa de tipo salvaje H44/76.

La morfología de H44/76[pHBK30] y su cepa progenitora fueron examinadas por microscopía electrónica de secciones ultrafinas. A diferencia del tipo salvaje, las células H44/76[pHBK30] eran más heterogéneas en tamaño y una fracción significativa mostró signos de lisis. No obstante, la membrana externa podía ser claramente distinguida en el mutante deficitario en LPS (fig. 5). A diferencia de la apariencia ligeramente “bolsuda” en el tipo salvaje, la membrana externa del mutante mostró un “entallado estrecho”, posiblemente indicando un nivel rebajado de síntesis.

Ejemplo 2

Construcción de un mutante knockout IpxA

Un mutante knockout *IpxA* de *N-Meningitidis* fue construido por inserción de un casete resistente a la canamicina en el sitio *BstEII* localizado en la posición 293 dentro del gen *IpxA* del plásmido pLA21 (un derivado pUC18 con un inserto *IpxD-fabZ-IpxA* de 2,1 kb). El plásmido resultante pLAK33 fue digerido con *XbaI/SacI* y transformado en la cepa H44/76 con selección para la resistencia a la canamicina. Como estaba previsto, las colonias resultantes mostraron las mismas propiedades de crecimiento que el mutante H44/76[pHBK30], indicando la falta de LPS. Esto fue confirmado por un ensayo ELISA de célula completa donde el mutante knockout *IpxA* no se unió a ninguno de los mAbs específicos de LPS. Estos resultados demostraron una vez más que el bloqueo de la vía de biosíntesis del lípido A en la cepa de *N. meningitidis* H44/76 conduce a mutantes viables deficientes en LPS.

ES 2 301 181 T3

Descripción detallada de los métodos y cepas usados en los ejemplos

Donde no se proveen detalles específicos, ha sido aplicada tecnología estándar.

5 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas NM522 y INV α F' de *E. coli* fueron hechas crecer en un medio LB a 37°C. La cepa H44/76 de *N. meningitidis* y sus derivados crecieron a 37°C en un medio base GC (Difco) complementado con IsoVitaleX (Becton Dickinson) en una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂, o en un medio líquido como se ha descrito (van der Ley *et al.*, 1993). Para la selección de los transformantes meningocócicos (van der Ley *et al.*, 1996) la canamicina fue usada en una concentración de 75-100 μ g/ml. Con *E. coli*, los antibióticos fueron usados en las concentraciones siguientes: ampicilina, 100 μ g/ml; canamicina, 100 μ g/ml. Para la clonación de fragmentos PCR, el kit de clonación de TA fue usado con el vector pCRII (Invitrogen). Otro vector usado fue pUC18.

15 Técnicas de ADN Recombinante

La mayoría de las técnicas de ADN recombinante eran como se describe en Sambrook *et al.* (1989). El ADN plásmido fue aislado usando el kit pLAsmix (Talent). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada en un sistema 9600 Perkin Elmer GeneAmp PCR con Taq polimerasa. El análisis de secuencias fue realizado con un secuenciador automático de Applied Biosystems en muestras de ADN de plásmidos de cadenas dobles (aislados con columnas Qiagen) y con un protocolo de secuenciación cíclica.

Análisis LPS

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico y tricina fue realizada en un 4% en geles agrupantes y en un 16% en geles separantes, como ha sido descrito por Lesse *et al.* (1990). Se usaron células bacterianas hervidas tratadas con proteinasa K como muestras. Los geles fueron hechos fluir durante 17 h a una corriente constante de 20 mA, y fueron teñidos con plata por el método de Tsai y Frasch (1982). El ensayo cromogénico LAL para la actividad de endotoxina fue realizado usando el kit QCL-1000 de BioWhittaker Inc. (Walkersville, MD, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Durante toda la noche los cultivos fueron diluidos en un medio meningocócico a un OD a 620 nm de 0,1, y diluciones en serie de estas provisiones fueron usadas como muestras en el ensayo LAL. Para el análisis de ácido graso por GC-MS, las muestras de OMC fueron acetiladas durante 3 h a 90°C en piridina y anhídrido de ácido acético para disolver completamente el LPS. Las muestras fueron posteriormente calentadas durante 3 h a 65°C en tetrahidrofurano en presencia de LiAlH₄ para reducir los ácidos grasos O-enlazados a los alcoholes libres. Estos fueron derivatizados a éteres de TMS durante 1 h a 60°C con BSTFA + 1% TMCS en piridina, y analizados por GC-MS en un Autospec (Micromass, Manchester, Reino Unido) en el modo de choque de electrones. La cantidad de 3-OH C12 en las muestras fue cuantificada usando 2-OH C12 como estándar interno.

40 Caracterización de la composición OMP

La unión de los mAbs específicos para las OMP de clase 1, 3 y 4 y para la parte oligosacárida del inmunotipo L3 LPS fue evaluado en un ensayo ELISA de célula entera (van der Ley *et al.*, 1995, 1996). El aislamiento de las OMC por extracción de sarcosil y su análisis por SDS-PAGE fueron hechos como se ha descrito previamente (van der Ley *et al.*, 1993).

45 Leyendas de las figuras

Figura 1. Construcción de H44/76[pHBK30]. Mutagénesis PCR en dos etapas que conducen al gen híbrido *IpxA*, con cebadores específicos de *E. coli* Epr1 (ACT-GACGCGTGTGATTGATAAATCCGC) id de secuencia n° 1 y Epr2 (GTACGGCGGCACCTCCTGCGCCACACCGGA) id de secuencia n° 2 y cebadores específicos de *N. meningitidis* Npr1 (TCCGGTGTGGCGCAGGACGTGCCGCCCTAC) id de secuencia. n° 3 y Npr2 (CGGCCGCTCTAGAAC-TAGTGGATCA) id de secuencia n° 4.

Figura 2. Construcción de H44/76[pHBK30]. Sustitución del lugar cromosómico *IpxD-fabZ-IpxA* con el inserto pHBK30, que soporta además del gen *IpxA* híbrido de *E. coli* -*N. meningitidis* un marcador de selección *kanR* en vez de la región de 99 bp entre el sitio MluI en *fabZ* y el codón de iniciación de *IpxA*.

Figura 3. Análisis SDS-PAGE de H44/76[pHBK30]. Gel LPS en Tricina-SDS-PAGE teñido en plata de lisados de célula entera tratados con proteinasa K H44/76 (vías 1 y 8) y seis transformantes independientes resistentes a la canamicina con pHBK30 (vías 2-7).

Figura 4. SDS-PAGE de proteínas OMC de H44/76[pHBK30] (vía 2) y tipo salvaje H44/76 (vía 3): la vía 1 contiene un marcador de peso molecular de 94. 67. 43. 30. 20.1 y 14,4 kDa.

Figura 5. Micrografía electrónica de una sección fina H44/76[pHBK30], que muestra la presencia de la membrana externa en la ausencia de LPS.

Referencias

- Akers**, M. J. *Parenteral Quality Control*. Chapter 2: Pyrogen Testing. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1985, pp. 79- 142.
- 5 **Ames**. G. F.-L., **Spudich**, E. N. and **Nikaido**, H.: Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J. Bacteriol.* 117 (1974) 406-416.
- 10 **Anderson**, M. S and **Raetz**, C. R. H: Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 5159-5169.
- 15 **De Cock**. H. and **Tommasen**, J.: Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly- competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E. coli*. *EMBO J.* 15 (1996) 5567-5573.
- 20 **Coleman**, J. and **Raetz**, C. R. H.: First committed step of lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*: Sequence of the IpxA gen e. *J. Bacteriol.* 170 (1988) 1268-1274.
- Gabler**, F. R. Pyrogens, and the depyrogenation of solutions with ultrafiltration membranes. In: Meltzer. T. H. Filtration in the pharmaceutical industry. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1987. pp. 919-939.
- Karnovsky**. M. J.: Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *Proc. 11th Ann. Meeting Soc. Cell Biol.* 51 (1971) 146.
- 25 **Koplow**. J. and **Goldfine**. H.: Alterations in the outer membrane of the cell envelope of heptose-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 117 (1974) 527-543.
- 30 **Kulshin**, V. A., **Zähringer**, U., **Lindner**, B., **Frasch** C. E., **Tsai**. C., **Dimitriev**, A. and **Rietschel**, E. T.: Structural characterization of the lipid A component of pathogenic *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 174 (1992) 1793-1800.
- 35 **Laird**, M. W., **Kloser**, A. W. and **Misra**, R.: Assembly of LamB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 176 (1994) 2259-2264. **Lesse**. A. J., **Campagnari**. A. A., **Bittner**. W. E. and **Apicella**. M. A.: Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilising tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Meth.* 126 (1990) 109-117.
- 40 **Van der Ley**, P., van der **Biezen**. J., **Hohenstein**, P., **Peeters**, C. and **Poolman**, J.T.: Use of transformation to construct antigenic hybrids of the class 1 outer membrane protein in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 61 (1993) 4217-4224.
- 45 **Van der Ley**, P., van der **Biezen**, J. and **Poolman**, J.T.: Construction of *Neisseria meningitidis* strains carrying multiple chromosomal copies of the porA gene for use in the production of a multivalent outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 13 (1995) 401.407.
- Van der Ley**. P., **Kramer**, M., **Steeghs**, L., **Kuipers**. B., **Andersen**, S. R., **Jennings**, M. P., **Moxon**, E. R. and **Poolman**, J. T.: Identification of a locus involved in meningococcal lipopolysaccharide biosynthesis by deletion mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 19 (1996) 1117-1125.
- 50 **Nakano**. M. and **Matsuura**. M.: **Lipid A**. In: Stewart-Tull. D.E.S. (Ed.). *The Theory and Practical Application of Adjuvants*. John Wiley & Sons. 1995, pp. 315-335.
- 55 **Onishi**, H. R., **Pelak**. B. A., **Gerckens**, L. S. *et al.*: Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science* 274 (1996) 980-982.
- Poolman**. J. T.: Development of a meningococcal vaccine. *Infect. Agents Dis.* 4 (1995) 13-28.
- 60 **Raetz**. C. R. H.: Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59 (1990) 129-170.
- Raetz**. C. R. H. and **Roderick**. S. L.: A left-handed parallel β helix in the structure of UDP-N-Acetylglucosamine acyltransferase. *Science* 270 (1995) 997-1000.
- 65 **Reid**. G., **Hindennach**. I. and **Henning**. U.: Role of lipopolysaccharide in assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA, OmpC and OmpF. *J. Bacteriol.* 172 (1990) 6048-6053.
- Sambrook**, J., **Fritsch**. E. F. and **Maniatis**, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- Sen**. K. and **Nikaido**. H.: Lipopolysaccharide structure required for *in vitro* trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. *J. Bacteriol.* 173 (1991) 926-928).

5 **Steeghs, L., Jennings, M. P., Poolman, J. T.** and van der **Ley, P.**: Isolation and characterization of the *Neisseria meningitidis* IpxD-fabZ-IpxA gene cluster involved in lipid A biosynthesis. *Gene* 190 (1997) 263-270. **Tsai, C. M.** and **Frasch, C. E.**: A sensitive silver stain for detecting lipopo-lysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119 (1982) 115-119.

10 **Verheul, A. F. M., Snippe, H.** and **Poolman, J. T.**: Meningococcal lipopolysaccharides: Virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 34-49.

15 **Vuorio, R., Härkönen, T., Tolvanen, M.** and **Vaara, M.**: The novel hexapeptide motif found in the acyltransferases LpxA and LpxD of lipid A biosynthesis is conserved in various bacteria. *FEBS Lett.* 337 (1994) 289-292.

20 **Zähringer, U., Lindner, B.** and **Rietschel, E. Th.**: Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. In: Horton, D. (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol.50. *Academic Press Inc*, San Diego, 1994, pp. 211-276.

Referencias citadas en la descripción

25 *Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.*

Patentes citadas en la descripción

30 - WO 9725061 A [0007]

- WO 9719688 A [0008]

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

35 - **AKERS, M. J.** *Parenteral Quality Control*. Chapter 2: Pyrogen Testing Marcel Dekker, Inc. 1985. 79-142 [0031]

40 - **AMES, G. F.-L.; SPUDICH, E. N.; NIKAIDO, H.** Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J. Bacteriol.*, 1974, vol. 117, 406-416 [0031]

45 - **ANDERSON, M. S.; RAETZ, C. R. H.** Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-0-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 5159-5169 [0031]

50 - **DE COCK, H.; TOMMASSEN, J.** Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E. coli*. *EMBO J.*, 1996, vol. 15, 5567-5573 [0031]

55 - **COLEMAN, J.; RAETZ, C. R. H.** First committed step of lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*: Sequence of the IpxA gene. *J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170, 1268-1274 [0031]

- Pyrogens, and the depyrogenation of solutions with ultrafiltration membranes. **GABLER, F. R.** *Filtration in the pharmaceutical industry*. Marcel Dekker, Inc. 1987. 919-939 [0031]

60 - **KARNOVSKY, M. J.** Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *Proc. 11th Ann. Meeting Soc. Cell Biol.*, 1971, vol. 51, 146- [0031]

65 - **KOPLow, J.; GOLDFINE, H.** Alterations in the outer membrane of the cell envelope of heptose-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1974, vol. 117, 527-543 [0031]

- **KULSHIN, V. A.; ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; FRASCH, C. E.; TSAI, C.; DIMITRIEV, A.; RIETSCHHEL, E. T.** Structural characterization of the lipid A component of pathogenic *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, 1793-1800 [0031]

70 - **LAIRD, M. W.; KLOSER, A. W.; MISRA, R.** Assembly of LamB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, 2259-2264 [0031]

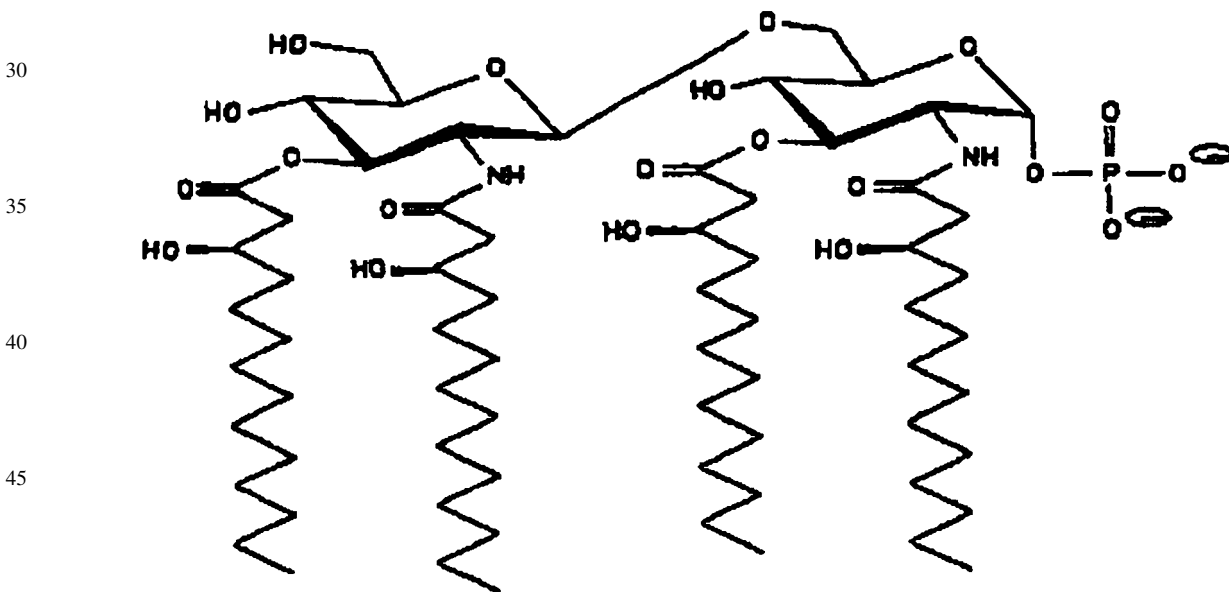
75 - **LESSE, A. J.; CAMPAGNARI, A. A.; BITTNER, W. E.; APICELLA, M. A.** Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilising tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Meth.*, 1990, vol. 126, 109-117 [0031]

ES 2 301 181 T3

- VAN DER LEY, P.; VAN DER BIEZEN, J.; HOHENSTEIN, P.; PEETERS, C.; POOLMAN, J. T. Use of transformation to construct antigenic hybrids of the class 1 outer membrane protein in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.*, 1993, vol. 61, 4217-4224 [0031]
- 5 - VAN DER LEY, P.; VAN DER BIEZEN, J.; POOLMAN, J. T. Construction of *Neisseria meningitidis* strains carrying multiple chromosomal copies of the *porA* gene for use in the production of a multivalent outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine*, 1995, vol. 13, 401-407 [0031]
- VAN DER LEY, P.; KRAMER, M.; STEEGHS, L.; KUIPERS, B.; ANDERSEN, S. R.; JENNINGS, M. P.;
10 MOXON, E. R.; POOLMAN, J. T. Identification of a locus involved in meningococcal lipopolysaccharide biosynthesis by deletion mutagenesis. *Mol. Microbiol.*, 1996, vol. 19, 1117-1125 [0031]
- NAKANO, M.; MATSUURA, M. The Theory and Practical Application of Adjuvants John Wiley & Sons 1995.
15 315-335 [0031]
- ONISHI, H. R.; PELAK, B. A.; GERCKENS, L. S. *et al.* Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science*, 1996, vol. 274, 980-982 [0031]
- POOLMAN, J. T. Development of a meningococcal vaccine. *Infect. Agents Dis.*, 1995, vol. 4, 13-28 [0031]
- 20 - RAETZ, C. R. H. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1990, vol. 59, 129-170 [0031]
- RAETZ, C. R. H.; RODERICK, S. L. A left-handed parallel β helix in the structure of UDP-N- Acetylglucosamine acyltransferase. *Science*, 1995, vol. 270, 997-1000 [0031]
- 25 - REID, G.; HINDENNACH, I.; HENNING, U. Role of lipopolysaccharide in assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA, OmpC and OmpF. *J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 6048-6053 [0031]
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring
30 Harbor Laboratory Press 1989. [0031]
- SEN, K.; NIKAIDO, H. Lipopolysaccharide structure required for *in vitro* trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, 926-928 [0031]
- 35 - STEEGHS, L.; JENNINGS, M. P.; POOLMAN, J. T.; VAN DER LEY, P. Isolation and characterization of the *Neisseria meningitidis* *lpxD-fabZ-lpxA* gene cluster involved in lipid A biosynthesis. *Gene*, 1997, vol. 190, 263-270 [0031]
- TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels.
40 *Anal. Biochem.*, 1982, vol. 119, 115-119 [0031]
- VERHEUL, A. F. M.; SNIPPE, H.; POOLMAN, J. T. Meningococcal lipopolysaccharides: Virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol. Rev.*, 1993, vol. 57, 34-49 [0031]
- 45 - VUORIO, R.; HÄRKÖNEN, T.; TOLVANEN, M.; VAARA, M. The novel hexapeptide motif found in the acyltransferases LpxA and LpxD of lipid A biosynthesis is conserved in various bacteria. *FEBS Lett.*, 1994, vol. 337, 289-292 [0031]
- Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHEL, E. TH. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Academic Press Inc* 1994.
50 vol. 50, 211-276 [0031]
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mutante Gram negativo de una bacteria mucosa, que comprende una mutación tal que es viable, es capaz de formar OMP y carece de lipopolisacáridos endotóxicos (LPS), estando el mutante libre de LPS.
2. Mutante Gram negativo según la reivindicación 1, que comprende una mutación tal que está libre de lípido A.
3. Mutante Gram negativo según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha bacteria es seleccionada del grupo comprendiendo diplococos.
- 10 4. Mutante Gram negativo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha bacteria es seleccionada del grupo comprendiendo gonococos, p. ej. *N. gonorrhoeae*.
- 15 5. Mutante Gram negativo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha bacteria es seleccionada del grupo comprendiendo meningococos p. ej. *N. meningitidis*.
- 20 6. Mutante Gram negativo según la reivindicación 1 ó 2, donde dicha bacteria es seleccionada del grupo comprendiendo *Rordetella*, p. ej. *Bordetella pertussis*.
7. Mutante Gram negativo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho mutante una mutación en al menos un gen asociado a la biosíntesis de lípido A.
- 25 8. Mutante Gram negativo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho mutante una mutación en al menos un gen asociado a la fase temprana de la biosíntesis de lípido A, siendo dicha fase temprana anterior a la formación de la estructura siguiente



- 30 9. Mutante Gram negativo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho mutante una mutación en al menos un gen detectado del grupo comprendiendo *IpxA*, *IpxD* y *IpxB*.
- 35 10. Mutante Gram negativo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho mutante una mutación en al menos el gen *IpxA*.
- 40 11. Vacuna de vida atenuada contra una bacteria mucosa Gram negativa, comprendiendo dicha vacuna un mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 como componente activo y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 45 12. Vacuna de célula completa contra una bacteria mucosa Gram negativa, comprendiendo dicha vacuna un mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 como componente activo y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 50 13. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, estando dicha vacuna sustancialmente libre de LPS endotóxico, donde sustancialmente libre es definido como libre de LPS según el ensayo *Limulus*.
- 55 14. Vacuna de membranas vesiculares externas contra una bacteria mucosa Gram negativa, comprendiendo dicha vacuna vesículas de membrana externa derivadas de un mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un

ES 2 301 181 T3

soporte farmacéuticamente aceptable, estando dicha vacuna sustancialmente libre de LPS endotóxico, donde sustancialmente libre es definido como libre de LPS según el ensayo Limulus.

5 15. Vacuna de vesícula de membrana externa según la reivindicación 14, comprendiendo dicha vesícula de membrana externa una OMP.

16. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 11-15 comprendiendo además un adyuvante.

10 17. Método para producir una vacuna libre de LPS, método incluyendo las etapas de:

a) cultivar un mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y,

15 b) mezclar el mutante o las vesículas de membrana externa derivadas del mutante con un soporte farmacéuticamente aceptable.

18. Método según la reivindicación 17, donde las vesículas de membrana externa comprenden una OMP.

19. Método para producir OMP libre de LPS, incluyendo el método las etapas de:

20 a) cultivar un mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y,

b) aislar la OMP de dicho cultivo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

fig -1

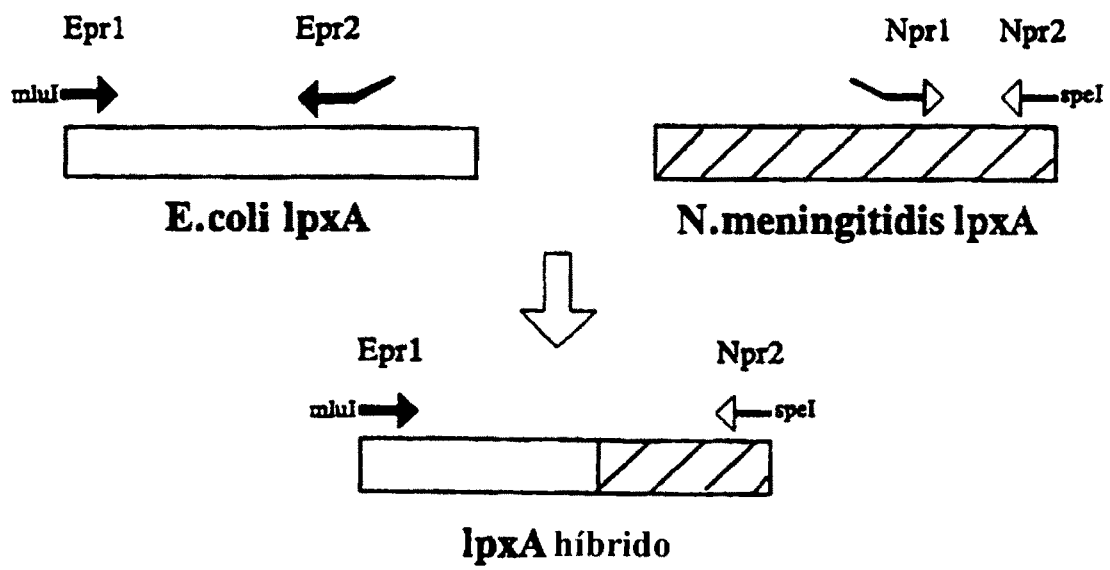


fig-2

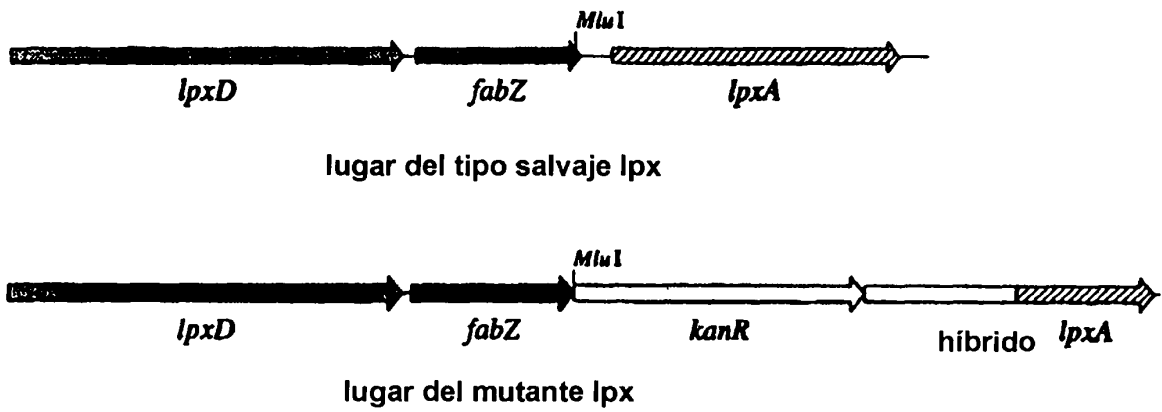


Figura 3

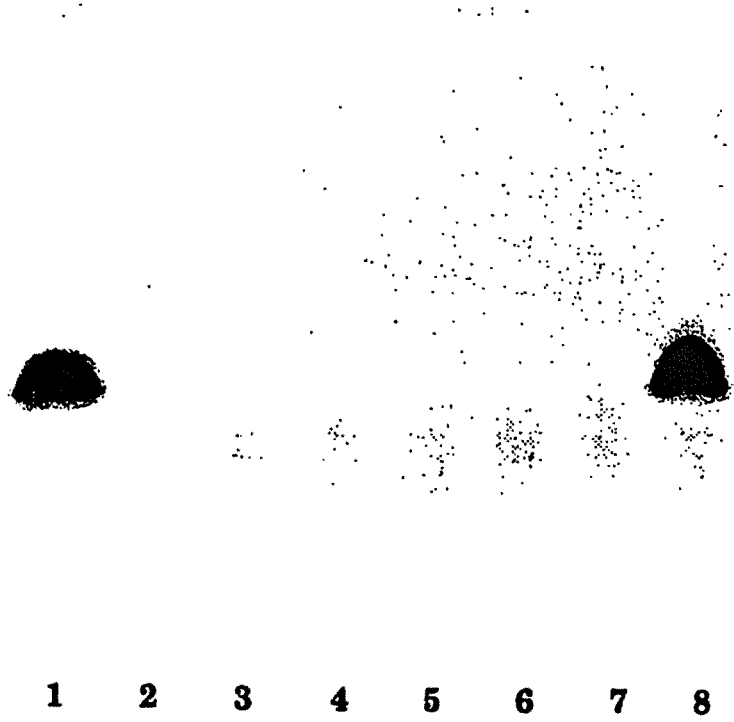


Figura 4

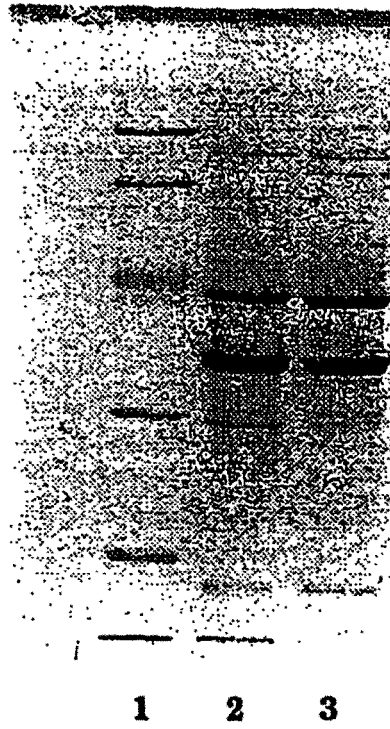
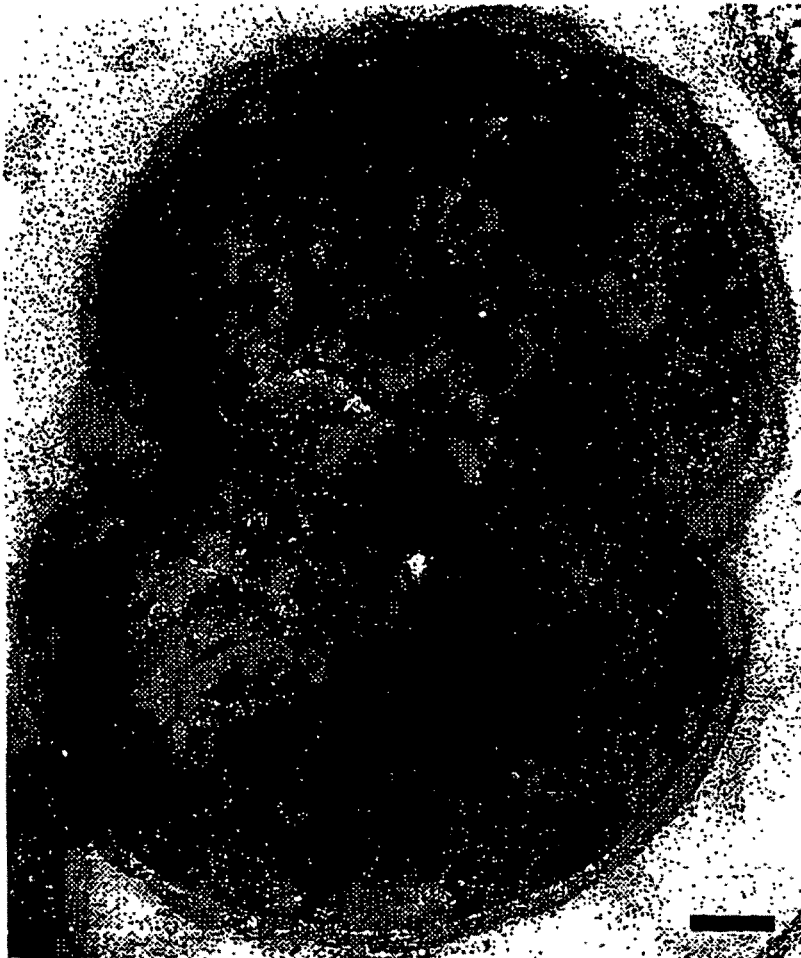


Figura 5



ES 2 301 181 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: De Staat der Nederlanden
 - (B) CALLE: P.O. box 1
 - 10 (C) CIUDAD: Bilthoven
 - (D) ESTADO: Utrecht
 - (E) PAÍS: Países Bajos
 - (F) CÓDIGO POSTAL (IDENTIFICACIÓN POSTAL): 3720 BA
- 15 (ii) TÍTULO DE INVENCIÓN: mutantes nuevos de bacterias mucosas Gram negativas y su aplicación en vacunas.
- (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 4
- 20 (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
 - (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
 - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatenteIn Edición #1.0. Versión #1.25 (EPO)

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA ID N°:1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 35 (C) TIPO DE CADENA: única
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- 40 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *E. coli*
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC N° ID: 1:
- 45 ACTGACGCGT GTGATTGATA AATCCGC 27

(3) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 2:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 55 (C) TIPO DE CADENA: único
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- 60 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *E. coli*
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 2:
- 65 GTAGGGCGGC ACGTCCTGCG CCACACCGGA 30

(4) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 3:

ES 2 301 181 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *N. meningitidis*

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO: 3:

TCCGGTGTGG CGCAGGACGT GCCGCCCTAC

30

(5) INFORMACIÓN DE LA SEC N° ID: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *N. meningitidis*

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 4:

CGGCCGCTCT AGAACTAGTG GATCA

25