

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 233**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

**C07K 14/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2009 E 09779121 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2331121**

54 Título: **Vacuna que comprende proteína NMB0964 de Neisseria meningitidis**

30 Prioridad:

**08.09.2008 GB 0816447**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.09.2013**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)  
rue de l'Institut, 89  
1330 Rixensart, BE y  
UNIVERSITY OF UTRECHT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOS, MARTINE PETRONELLA;  
POOLMAN, JAN;  
STORK, MICHIEL;  
TOMMASSEN, JOHANNES PETRUS MARIA y  
WEYNANTS, VINCENT**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 424 233 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

Vacuna que comprende proteína NMB0964 de *Neisseria meningitidis*

**Campo de la Invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas para la prevención de enfermedades originadas por la bacteria *Neisseria*, en particular *Neisseria meningitidis*.

**Antecedentes de la Invención**

Las cepas de la bacteria *Neisseria* son agentes que causan una cantidad de patologías en humanos, contra las cuales existe la necesidad de que se desarrollen vacunas efectivas. En particular, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* originan patologías que pueden ser tratadas mediante vacunación.

10 *Neisseria gonorrhoeae* es el agente etiológico de gonorrea, una de las enfermedades de transmisión sexual de las que se informa con mayor frecuencia en el mundo, con una incidencia anual estimada de 62 millones de casos (Gerbase y col 1998 Lancet 351; (Supl 3) 2-4). Las manifestaciones clínicas de gonorrea incluyen inflamación de las membranas mucosas del tracto urogenital, garganta o recto e infecciones en ojos de neonatos. Las infecciones gonocócicas en incremento en mujeres, pueden conducir a infertilidad, embarazo ectópico, enfermedad inflamatoria pélvica crónica y formación de abscesos tubo-ováricos. La septicemia, artritis, endocarditis y meningitis están asociadas con gonorrea complicada.

El alto número de cepas gonocócicas con resistencia a antibióticos, contribuye a una morbilidad incrementada y a complicaciones asociadas con gonorrea. Una alternativa atractiva de tratamiento de gonorrea con antibióticos, puede ser su prevención usando vacunación. Actualmente no existe una vacuna para infecciones de *N. gonorrhoeae*.

20 *Neisseria meningitidis* es un patógeno importante, particularmente en niños y adultos jóvenes. La septicemia y meningitis son las formas de enfermedad meningocócica invasiva (IMD), que implican un mayor riesgo de perder la vida. Esta enfermedad se ha vuelto un problema de salud a nivel mundial debido a su alta morbilidad y mortalidad.

Se han identificado 30 serogrupos de *N. meningitidis* con base en diferencias antigénicas en los polisacáridos capsulares, siendo los más comunes A, B y C que son responsables del 90 % de la enfermedad a nivel mundial. El serogrupo B, es la causa más común de enfermedad meningocócica en Europa, E.U.A. y diversos países de Latinoamérica.

Las vacunas basadas en el polisacárido capsular de los serogrupos A, C, W y Y, han sido desarrolladas y han demostrado controlar los desencadenamientos de enfermedad meningocócica (Peltola y col. 1985 Pediatrics 76; 91-96). Sin embargo el serogrupo B es débilmente inmunogénico e induce únicamente a una respuesta de anticuerpo temporal de un isotipo predominantemente IgM (Ala'Aldeen D y Cartwright K 1996, J. Infect. 33; 153-157). Por consiguiente, no existe actualmente disponible una vacuna ampliamente efectiva contra meningococo del serogrupo B, el cual es el responsable de la mayoría de las enfermedades en la mayoría de los países templados. Esto es particularmente problemático, ya que la incidencia de la enfermedad de serotipo B está aumentando en Europa, Australia y América, en su mayoría en niños menores de 5 años. El desarrollo de una vacuna contra meningococo del serogrupo B, presenta dificultades particulares debido a que la cápsula de polisacárido es débilmente inmunogénica debido a su similitud inmunológica con la molécula de adhesión de célula neural humana. Las estrategias para producción de vacunas, han estado concentradas por lo tanto en las estructuras expuestas a la superficie de la membrana externa meningocócica, pero han sido obstaculizadas por variaciones marcadas en estos antígenos entre las cepas. El documento WO01/65772 y base de datos Geneseq, 12 de marzo de 2002, n° de referencia AAU73011 desvelan una "proteína de virulencia de *Neisseria meningitidis* n° 101". Vaughan y col. 2006, Vaccine 24:5277-5293 desvelan antígenos de vacuna de vesícula de membrana externa de *Neisseria lactamica* y *meningitidis*.

Otros avances han conducido a la introducción de vacunas elaboradas de vesículas de membrana externa que contendrán varias proteínas que constituyen el contenido normal de la membrana bacteriana. Una de estas es la vacuna Cubana VA-MENGOC-BC contra serogrupos B y C *N. meningitidis* (Rodríguez y col. 1999 Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94; 433-440). Esta vacuna fue diseñada para combatir un desencadenamiento invasivo de enfermedad meningocócica en Cuba, el cual no había sido eliminado mediante un programa de vacunación usando una vacuna de polisacárido capsular AC. Los serogrupos prevaletentes fueron B y C y la vacuna VA-MENGOC-BC® tuvo éxito en controlar el desencadenamiento con una eficiencia de vacuna estimada del 83 % contra las cepas del serogrupo B de *N. meningitidis* (Sierra y col. 1990 en *Neisseria*, Walter Gruyter, Berlin, M. Achtman y col. (eds) p 129-134, Sierra y col. 1991, NIPH Ann 14; 195-210). Esta vacuna fue efectiva contra un desencadenamiento específico, sin embargo la respuesta inmune provocada, no puede proteger contra otras cepas de *N. meningitidis*.

Los estudios de eficacia subsecuentes conducidos en Latinoamérica durante epidemias, originadas por cepas meningocócicas de serogrupo B homólogas y heterólogas, han mostrado algo de eficacia en niños de más edad y en adultos, pero su efectividad fue significativamente menor en niños pequeños, quienes están en mayor riesgo de infección (Milagres y col. 1994, Infect. Immun. 62; 4419-4424). Es cuestionable cuán efectiva puede ser una vacuna en países con enfermedad endémica de multicepa, tales como Reino Unido. Los estudios de inmunogenicidad contra cepas heterólogas han demostrado únicamente actividad bactericida de suero de reacción cruzada limitada, especialmente en infantes (Tappero y col. 1999, JAMA 281; 1520-1527).

En Noruega se desarrolló una segunda vacuna de vesícula de membrana externa, usando un aislado de serotipo B típico de los prevalecientes en Escandinavia (Fredriksen y col. 1991, NIPH Ann, 14; 67-80). Esta vacuna se probó en pruebas clínicas y se encontró que tiene eficacia protectora del 57 %, después de 29 meses (Bjune y col. 1991, Lancet, 338; 1093-1096).

Existen diversos problemas con las vacunas anti-meningocócicas actualmente disponibles. Las vacunas de membrana externa a base de proteína tienden a ser específicas y efectivas únicamente contra algunas cepas. Las vacunas de polisacárido también son sub-óptimas, ya que tienden a provocar respuestas inmunes deficientes y cortas, particularmente contra el serogrupo B (Lepow y col. 1986, J. Infect. Dis. 154:1033-1036; Peltola 1985, Pediatrics 76; 91-96).

Las infecciones de *Neisseria* representan un problema de salud considerable para el cual no hay disponibles vacunas en el caso de *N. gonorrhoeae* o hay disponibles vacunas con limitaciones en su eficacia y capacidad de proteger contra cepas heterólogas, en el caso de *N. meningitidis*. Existe claramente la necesidad de desarrollar vacunas superiores contra infecciones de *Neisseria*, que mejorarán la eficacia de vacunas normalmente disponibles y permitirán la protección contra un mayor rango de cepas.

### **Sumario de la Invención**

Los inventores de la presente invención, han encontrado que el antígeno de *Neisseria* NMB0964 (los números de NMB se refieren a las secuencias del genoma de *Neisseria meningitidis* del grupo B disponibles en [www.neisseria.org](http://www.neisseria.org)) [conocido como NMA1161 en el genoma del grupo A de *Neisseria meningitidis* de la cepa Z2491, y BASB082 en la Publicación Internacional WO 00/55327, y como ZnuD] es un antígeno conservado en *Neisseria* y puede inducir anticuerpos bactericidas contra un rango de cepas de *Neisseria*. Los inventores de la presente invención han descubierto que este antígeno funciona como un receptor Zn<sup>2+</sup> en la bacteria, y su expresión es regulada por el nivel de Zn<sup>2+</sup> en el medio.

La presente invención proporciona de manera general procedimientos y composiciones para generar una respuesta inmune contra la especie de bacteria de *Neisseria* spp. en un sujeto, particularmente contra la cepa de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B.

En un aspecto la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: vesículas de membrana externa aisladas preparadas de una especie de bacteria de *Neisseria*, en donde la especie de bacteria de *Neisseria* produce un nivel de polipéptido NMB0964 suficiente para producir de una vesícula que, cuando se administra a un sujeto, genera anticuerpos anti-NMB0964; y un excipiente farmacéuticamente, en el que

(i) dicha especie de bacteria de *Neisseria* está modificada genéticamente a través de la interrupción de la expresión funcional del represor Zur (NMB1266); y/o

(ii) dicha especie de bacteria de *Neisseria* se cultiva en un medio que tiene menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01  $\mu\text{M}$  de Zn<sup>2+</sup> libre; o

(iii) dicha especie de bacteria de *Neisseria* se cultiva en un medio que comprende un quelador de Zn<sup>2+</sup>.

En un aspecto adicional se proporciona un procedimiento para producir una composición inmunogénica, comprendiendo el procedimiento: cultivar una especie de bacteria de *Neisseria*, que produce un polipéptido NMB0964, que en la cepa de *N. meningitidis* MC58 tiene la secuencia mostrada en la Figura S1, en el que el polipéptido NMB0964 se produce a un nivel suficiente para producir de vesículas de membrana externa que, cuando se administra a un sujeto, genera anticuerpos anti-NMB0964; preparar vesículas de membrana externa de la bacteria cultivada; y combinar las vesículas de membrana externa con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición inmunogénica adecuada para su administración a un sujeto, en el que

(i) dicha especie de bacteria de *Neisseria* está modificada genéticamente a través de la interrupción de la expresión funcional del represor Zur (NMB1266); y/o

(ii) dicho cultivo de especie de bacteria de *Neisseria* es en un medio que tiene menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01  $\mu\text{M}$  de Zn<sup>2+</sup> libre; o

(iii) dicho cultivo de especie de bacteria de *Neisseria* es en un medio que comprende un quelador de Zn<sup>2+</sup>.

5 Esto puede conseguirse debido a que la especie de bacteria de *Neisseria* está modificada genéticamente en la producción del polipéptido NMB0964 por ejemplo: alterando la expresión funcional del represor Zur (NMB1266), una proteína que apaga la expresión de NMB0964 en presencia de  $Zn^{2+}$  en el medio; o mediante el uso de un medio bajo en concentración de  $Zn^{2+}$ , es decir menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01  $\mu M$  de  $Zn^{2+}$  libre, (tal como medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) que tiene aproximadamente 1,69  $\mu M$  de  $Zn^{2+}$  por ICP-MS) o retirando  $Zn^{2+}$  en el medio, por ejemplo usando un quelador de zinc conocido, tal como TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis-(2-piridilmetil)-Etilendiamina), debería añadirse suficiente al medio de modo que se maximice la expresión del NMB0964.

10 La especie de bacteria de *Neisseria* puede tener deficiencia en el polisacárido capsular, por ejemplo, a través de interrupción de la expresión funcional del gen *siaD*. Se puede interrumpir en la expresión funcional de los genes *msbB* y/o *htrB* para desintoxicar el LOS en la vesícula de la membrana externa. Se puede interrumpir en la expresión de uno o más de los siguientes genes: *PorA*, *PorB*, *OpA*, *OpC*, *PilC*, o *FrpB*. Se puede interrumpir en la expresión funcional del gen *IgtB*. Dichos procedimientos de interrupción se describen en las Publicaciones internacionales WO 01/09350 y WO2004/014417. La especie de bacteria de *Neisseria* puede ser del inmunitipo L2 o L3.

15 Los procedimientos para la preparación o aislamiento de vesículas de membrana externa (también conocidas como microvesículas o ampollas) procedentes de la cepas de *Neisseria*, son conocidos en la técnica y se describen en los documentos WO 01/09350 y WO2004/014417. Las vesículas de membrana externa normalmente son aisladas extrayendo ya sea sin un detergente, o con 0-0,5, 0,02-0,4, 0,04-0,3, 0,06-0,2, o 0,08-0,15 % de detergente, por ejemplo desoxicolato, por ejemplo con aproximadamente o exactamente 0,1 % de desoxicolato.

## 20 Breve Descripción de las Figuras

25 **Figura 1. Detección de Tdfl en transferencia de Western.** (A) HB-1 crecido en TSB (columna 1), RPMI (columna 2) y cepa de eliminación *tdfl* desarrollada en RPMI (columna 3). (B) HB-1 desarrollada en RPMI con cantidades en incremento de TSB agregado. (C) HB-1 crecido en RPMI (columna 1), suplementado con 0,5  $\mu M$  de zinc (columna 2) o 1  $\mu M$  de zinc (columna 4). (D) HB-1 crecido en RPMI (columna 1), con concentraciones en incremento de TPEN (0,1, 0,5 y 1  $\mu M$  en columnas 2-4, respectivamente).

**Figura 2. Expresión de Tdfl en cepas mutantes *zur* y tipo silvestre.** La presencia de Tdfl en los lisados celulares de HB-1 y el mutante *zur* crecido en RPMI, RPMI con 600 nM de zinc o TSB, se evaluó mediante análisis de transferencia de Western.

30 **Figura 3. Modelo de topología de Tdfl.** El dominio de tapón se colorea con gris oscuro, las hebras beta con color gris claro y los lazos o bucles extracelulares con color blanco. Se encierran en cuadros los tramos de histidina/ácido aspártico.

**Figura 4. Enlace de zinc y transporte mediante Tdfl.** (A) Se midió el enlace de zinc a vesículas de membrana externa que contienen o no Tdfl a través de un ensayo de competición PAR. (B) Concentraciones de zinc intracelular tal como se mide mediante ICP-MS de la cepa tipo silvestre, el mutante *tdfl* y el mutante *tonB*.

35 **Figura 5. La regulación de zinc de Tdfl es altamente conservada en meningococos.** Transferencia de Western de lisados celulares de las cepas indicadas desarrolladas en RPMI con o sin zinc agregado. <sup>a</sup>Designaciones del grupo clonal tomadas de (36); - indica que la cepa fue tipificada mediante Electroforesis de Enzima de Multi-Locus, pero no puede ser asignada a un clon específico.

40 **Figura 6. Perfil de proteína de la vacuna Tdfl.** Vesículas de membrana externa usadas para inmunizar ratones para producción de anti-suero se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

**Figura 7. Impacto de IPTG en expresión de Tdfl en células usadas en SBA.** Ver Ejemplo 1.

45 **Figura 1 Suplementaria.** Alineación de secuencias de aminoácidos de Tdfl de cepas *N. meningitidis* MC58 con las de 053422, FAM18 y Z2491, las cepas transportadoras  $\alpha 14$ ,  $\alpha 153$  y  $\alpha 275$ . El cuadro de TonB (Tb), el dominio de tapón, los lazos y los dominios de transmembrana (Tm) están marcados encima de la secuencia y están subrayadas los estiramientos con alto contenido de His- y Asp.

**Figura 2 Suplementaria.** Alineación de secuencias de aminoácidos de los homólogos de Tdfl. Los tramos con alto contenido de ácido aspártico de Histidina, se señalan con color gris.

## Descripción Detallada de la Invención

50 La presente invención está basada en el descubrimiento de que una vacuna OMV preparada ya sea en condiciones de cultivo específicas con bajo contenido de  $Zn^{2+}$ , o de una cepa de *N. meningitidis* mutante construida ya sea para sobre-

expresar NMB0964 o para eliminar el mecanismo de represión de zinc transmitido a través de Zur, está enriquecida con NMB0964, y dichas OMV pueden generar buenas respuestas de anticuerpo bactericidas en comparación con OMV, que no han sido preparadas con estos procedimientos.

5 El término polipéptido NMB0964 en el presente documento incluye el polipéptido de *Neisseria Tdfl* (codificado por el gen  
tdfl) en general, de cualquier cepa neisserial (la proteína está tan bien conservada entre las cepas neisseriales que su  
identidad en cualquier cepa neisserial particular es fácilmente confirmable por los expertos en la técnica). Por lo tanto, el  
término incluye la secuencia NMA1161, y la secuencia de polipéptido BASB082 (y todos los Polipéptidos de la presente  
invención con respecto al polipéptido BASB082) del documento WO 00/55327. Por ejemplo, el polipéptido NMB0964 de  
10 la presente invención, cubrirá la SEC ID NO: 2 del documento WO00/55327 o los polipéptidos con más de 70, 80, 90 o  
95 % de identidad de secuencia con dicha SEC ID NO:2, o polipéptidos que comprenden fragmentos inmunogénicos de  
7, 10, 12, 15 o 20 (o más) aminoácidos contiguos de dicha SEC ID NO: 2 (en particular dichos fragmentos  
inmunogénicos que tienen la capacidad de generar - si es necesario cuando se acoplan a un transportador de proteína -  
una respuesta inmune que puede reconocer dicha SEC ID NO: 2). Las modalidades particularmente preferidas del  
15 fragmentos inmunogénico NMB0964, son aquellas secuencias de lazo extracelular que se muestran en el diagrama de  
topología de la figura 3, tal como se aplica para cualquier secuencia NMB0964 determinada. En particular, se  
proporciona el tercer lazo extracelular (en donde los 2 residuos Cys son opcionalmente enlazados por disulfuro o no).  
Dichas secuencias de polipéptido de fragmento inmunogénico NMB0964, pueden tener más de 70, 80, 90 o 95 % de  
identidad de secuencia con dichas secuencias de lazo extracelulares (tal como se define en la figura 3) de la SEC ID  
20 NO:2 del documento WO 00/55327, o pueden ser polipéptidos que comprenden fragmentos inmunogénicos de 7, 10, 12,  
15 o 20 (o más) aminoácidos contiguos de dichas secuencias de lazo extracelular (tal como se definen en la figura 3) de  
la SEC ID NO: 2 (en particular dichos fragmentos inmunogénicos que tienen la capacidad de generar - si es necesario  
cuando se acoplan a un transportador de proteína - una respuesta inmune que puede reconocer dicha SEC ID NO: 2) y  
se proporcionan como los polipéptidos NMB0964 de la invención. Dichas secuencias de polipéptido de fragmentos  
25 inmunogénico NMB0964 pueden tener más del 70, 80, 90, 95, 99 o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia  
de la tercera secuencia de lazo extracelular proporcionada en la figura 3 (en donde opcionalmente los 2 residuos Cys  
deben ser conservados, y pueden o no estar enlazados por disulfuro) o pueden ser polipéptidos que comprenden  
fragmentos inmunogénicos de 7, 10, 12, 15 o 20 (o más) aminoácidos contiguos de la secuencia de lazo extracelular (en  
particular teniendo dichos fragmentos inmunogénicos, la capacidad de generar - si es necesario cuando se acoplan a un  
30 transportador de proteína - una respuesta inmune que puede reconocer la SEC ID NO: 2 del documento WO00/55327) y  
se proporcionan como los polipéptidos NMB0964 de la invención. En una modalidad, los polipéptidos de fragmento  
inmunogénico NMB0964 son polipéptidos de longitud no total NMB0964 (secuencia madura o con secuencia de señal).  
Por lo tanto un aspecto adicional de la presente invención es una composición inmunogénica que comprende las  
secuencias de polipéptido de fragmentos inmunogénico NMB0964 de la invención, y un excipiente farmacéuticamente  
aceptable.

35 La expresión "un nivel de polipéptido NMB0964 suficiente para producir de una vesícula que, cuando se administra a un  
sujeto, induce anticuerpos anti-NMB0964", en una modalidad indica que el nivel es suficiente para inducir anticuerpos  
bactericidas detectables, por ejemplo títulos de SBA de 100 o más, por ejemplo indica que las vesículas de membrana  
externa con un contenido total de proteína de 5 µg de la invención, cuando se inyectan en forma intramuscular en  
40 ratones en los días 0, 21 y 28 produce suero el día 42 que genera un titulador SBA de más de 100 (por ejemplo mayor  
de 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 700, 900 o 1000) usando el ensayo SBA en la sección de "Ensayo Bactericida de  
Suero" del Ejemplo 2.

El promotor heterólogo asociado con el polipéptido de la invención, que es "más fuerte" que el promotor endógeno no  
reprimido del polipéptido de la presente invención, significa que su uso da como resultado la expresión de más  
polipéptido de la invención, que cuando se usa un promotor endógeno no reprimido del polipéptido de la invención.

45 El término "inmunidad protectora" significa que un programa de vacunación o inmunización que se administra a un  
mamífero, induce una respuesta inmune que evita, retarda el desarrollo de o reduce la gravedad de una enfermedad que  
se origina por *Neisseria meningitidis*, o disminuye o en conjunto elimina los síntomas de la enfermedad.

La frase "enfermedad originada por una cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*" comprende cualquier síntoma  
clínico o combinación de síntomas clínicos que están presentes en una infección con un miembro del serogrupo B de  
50 *Neisseria meningitidis*. Estos síntomas incluyen pero no se limitan a: colonización del tracto respiratorio superior (por  
ejemplo, mucosa de la nasofaringe y amígdalas) a través de una cepa patógena del serogrupo B de *Neisseria  
meningitidis*, penetración de la bacteria en la mucosa y el lecho vascular submucoso, septicemia, choque séptico,  
inflamación, lesiones de piel hemorrágicas, activación de fibrinólisis y de coagulación de sangre, disfunción de órgano tal  
como riñón, pulmón e insuficiencia cardíaca, hemorragia suprarrenal e infarto muscular, filtración capilar, edema,  
55 isquemia de extremidad periférica, síndrome de dificultad respiratoria, pericarditis y meningitis.

“Serogrupo” tal como se usa en la presente invención se refiere a la clasificación de *Neisseria meningitidis* en virtud de las variaciones inmunológicamente detectables en el polisacárido capsular. Se conocen aproximadamente 12 serogrupos: A, B, C, X, Y, Z, 29-E, W-135, H, I, K y L. Cualquier serogrupo puede comprender múltiples serotipos y múltiples serosubtipos.

5 El término “enriquecido” significa que un antígeno en una composición de antígenos es manipulado por un experimentador o un médico, de modo que está presente en una concentración de al menos 3 veces más en peso total, normalmente una concentración de al menos 5-veces más, más preferentemente una concentración de al menos 10-veces más, o una concentración de al menos 100-veces más que la concentración de dicho antígeno en la cepa de la cual se obtuvo la composición de antígeno. Por lo tanto, si la concentración de un antígeno particular es de 1  
10 microgramo por gramo de la preparación bacteriana total (o de la proteína bacteriana total) una preparación enriquecida puede contener al menos 3 microgramos por gramo de la preparación bacteriana total (o de la proteína bacteriana total).

El polipéptido NMB0964 de la invención puede estar enriquecido en las vesículas de la membrana externa de la invención a través de los procedimientos aquí descritos (por ejemplo, las condiciones de cultivo o la sobre-expresión del polipéptido a través de medios recombinantes).

15 El término “heterólogo” se refiere a dos componentes biológicos que no se encuentran juntos en la naturaleza. Los componentes pueden ser células huésped, genes, regiones reguladoras, tales como promotores. Aunque los componentes heterólogos no se encuentran juntos en la naturaleza, pueden funcionar juntos, como cuando un promotor heterólogo de un gen, está enlazado de forma operativa al gen. Otro ejemplo es cuando una secuencia de *Neisseria* es heteróloga de un receptor de *Neisseria* de una cepa diferente. “Heterólogo” tal como se usa en la presente invención dentro del contexto de las proteínas expresadas en 2 diferentes cepas bacterianas, indica que las proteínas en cuestión  
20 difieren en la secuencia de aminoácidos.

La cepa de producción puede ser una cepa con deficiencia de cápsula. Las cepas con deficiencia de cápsula pueden proporcionar vacunas a base de vesícula que proporcionan un riesgo reducido en la generación de una respuesta de auto-anticuerpo significativa en un sujeto al cual se administra la vacuna (por ejemplo, debido a la producción de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con ácido siálico en superficies de células huésped). “Deficiencia de cápsula” o “deficiencia en el polisacárido capsular” tal como se usan en la presente invención, se refieren a un nivel de polisacárido capsular en la superficie bacteriana que es inferior a la de una cepa que ocurre naturalmente, o en donde la cepa está genéticamente modificada, es inferior a la de una cepa de origen de la cual se deriva la cepa con deficiencia de cápsula. Una cepa con deficiencia de cápsula incluye cepas que tienen una producción disminuida de polisacárido capsular de la superficie en al menos el 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más, e incluye cepas en las cuales el polisacárido no es detectable en la superficie bacteriana (por ejemplo, mediante ELISA de célula completa usando un anticuerpo anti-polisacárido capsular).  
25  
30

Las cepas con deficiencia de cápsula incluyen las que tienen deficiencia de cápsula debido a una modificación genética que ocurre naturalmente o que es generada en forma recombinante. Las cepas con deficiencia de cápsula que ocurren naturalmente (ver, por ejemplo, Dolan-Livengood y col. J. Infect. Dis. (2003) 187(10): 1616-28), así como los procedimientos para identificar y/o generar cepas con deficiencia de cápsula (ver, por ejemplo, Fisseha y col. (2005) Infect. Immun. 73(7):4070-4080; Stephens y col. (1991) Infect Immun 59(11):4097-102; Frosch y col. (1990) Mol Microbiol. 1990 4(7):1215-1218) son conocidos en la técnica.  
35

La modificación de una célula receptora de *Neisseria* que proporciona una producción disminuida del polisacárido capsular, puede incluir modificación de uno o más genes implicados en la síntesis de cápsula, en donde la modificación proporciona, por ejemplo, niveles disminuidos de polisacárido capsular en forma relativa a una célula de origen antes de la modificación. Dichas modificaciones genéticas pueden incluir cambios en las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en uno o más genes de biosíntesis de cápsula que hacen que la cepa tenga deficiencia de la cápsula (por ejemplo, debido a una o más inserciones, eliminaciones, sustituciones y similares en uno o más genes de biosíntesis de cápsula. Las cepas con deficiencia de cápsula pueden carecer de o ser no funcionales para uno o más genes de cápsula. De interés particular son las cepas que tienen deficiencia en biosíntesis de ácido siálico.  
40  
45

Dichas cepas pueden producir de vesículas que tienen un riesgo reducido de generar anticuerpos anti-ácido siálico que reaccionan en forma cruzada con antígenos de ácido siálico humanos, y pueden proporcionar además una seguridad de fabricación mejorada. Las cepas que tienen un defecto en la biosíntesis de ácido siálico (debido ya sea a una modificación que ocurre naturalmente o una modificación construida) pueden tener defectos en cualquiera de un número de diferentes genes en la ruta biosintética del ácido siálico. De particular interés son las cepas que tienen defecto en un producto de gen codificado por el gen de 2-epimerasa de N-acetilglucosamina-6-fosfato (conocido como synX AAF40537.1 o siaA AAA20475), siendo de especial interés cepas que tienen este gen desactivado. Por ejemplo, en una modalidad, se genera una cepa con deficiencia de cápsula, mediante la interrupción de la producción de un producto de gen synX funcional (ver, por ejemplo, Swartley y col. (1994) J Bacteriol. 176(5):1530-4).  
50  
55

También se pueden generar cepas con deficiencia capsular a partir de cepas que ocurren naturalmente usando técnicas no recombinantes, por ejemplo, a través del uso de anticuerpos anti-capsulares bactericidas para seleccionar cepas que tienen reducción del polisacárido capsular.

5 En general tal como se describió anteriormente, se pueden producir vesículas de acuerdo con la invención usando una cepa de *Neisseria* que no ocurre naturalmente modificada o que ocurre naturalmente, que produce vesículas con suficiente proteína NMB0964, que, cuando se administran a un sujeto, proporcionan la producción de anticuerpos anti-NMB0964.

10 En una modalidad, la cepa de *Neisseria* usada para producir vesículas de acuerdo con la invención, pueden ser cepas que ocurren naturalmente que expresan un mayor nivel de NMB0964 con relación a cepas que expresan un nivel de NMB0964 no detectable o bajo.

En otra modalidad, la cepa de *Neisseria* se modifica mediante técnicas recombinantes o no recombinantes para proporcionar un nivel lo suficientemente alto de producción de NMB0964.

15 Dichas cepas modificadas generalmente son producidas para proporcionar un incremento en la producción de NMB0964 que es del 1,5, 2, 2,5 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10-veces o más con respecto a la producción de NMB0964 en la célula parental no modificada o con respecto a la producción de NMB0964 de la cepa RM1090 o H44/76. Se puede usar cualquier cepa adecuada en esta modalidad, incluyendo cepas que producen niveles bajos o indetectables de NMB0964 antes de la modificación, y cepas que producen naturalmente altos niveles de NMB0964 con relación a cepas que expresan un nivel de NMB0964 no detectable o bajo.

20 Se pueden producir cepas modificadas de la divulgación usando técnicas recombinantes, normalmente mediante introducción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido NMB0964, o manipulación de un gen NMB0964 endógeno para proporcionar la expresión incrementada de NMB0964 endógeno.

Tal como se observó anteriormente, esto se puede realizar mediante introducción del ácido nucleico que codifica un polipéptido NMB0964 o manipulación de un gen NMB0964 endógeno para proporcionar la expresión incrementada de NMB0964 endógeno.

25 La expresión de NMB0964 endógeno se puede incrementar alterando *in situ* la región reguladora que controla la expresión de NMB0964. Los procedimientos para proporcionar una expresión incrementada de un gen de *Neisseria* endógeno son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, el documento WO 02/09746).

30 La modificación de una célula huésped de *Neisseria* para proporcionar una producción incrementada de NMB0964 endógeno, puede incluir el reemplazo parcial o total de toda o una parte del gen endógeno que controla la expresión de NMB0964, en donde la modificación proporciona, por ejemplo, una actividad de transcripción mejorada con relación a la cepa de origen no modificada.

35 La actividad de transcripción incrementada puede ser conferida mediante variantes (mutaciones puntuales, eliminaciones y/o inserciones) de las regiones de control endógeno, mediante promotores heterólogos modificados o que ocurren naturalmente o mediante una combinación de los dos. En general, la modificación genética confiere una actividad de transcripción mayor que la de la actividad de transcripción endógena no modificada (por ejemplo, mediante introducción de un promotor fuerte) que da como resultado la expresión mejorada de NMB0964.

40 Los promotores fuertes típicos que pueden ser útiles en el incremento de la producción de transcripción NMB0964, pueden incluir por ejemplo, los promotores de porA, porB, lbpB, tpbB, p110, hpuAB, lgtF, Opa, p110, 1st, y hpuAB. PorA, RmpM y PorB son de particular interés como promotores fuertes, constitutivos. La actividad de promotor PorB está contenida en un fragmento que corresponde a los nucleótidos -1 a -250 cadena arriba del codón de inicio de porB.

45 En la técnica están disponibles procedimientos para lograr la introducción de un promotor en un genoma de célula huésped, para enlazar operativamente el promotor a un ácido nucleico que codifica NMB0964 endógeno. Por ejemplo, una tecnología de recombinación homóloga de doble cruce que introduce un promotor en una región cadena arriba de la secuencia de codificación, por ejemplo, aproximadamente 1000 pb, de aproximadamente 30-970 pb, aproximadamente 200-600 pb, aproximadamente 300-500 pb, o aproximadamente 400 pb cadena arriba (5') del codón ATG de inicio de la secuencia de ácido nucleico que codifica NMB0964, para posibilitar la regulación positiva. Se puede determinar la colocación óptima del promotor a través del uso de rutina de los procedimientos disponibles en la técnica.

50 Por ejemplo, un promotor altamente activo (por ejemplo, promotores PorA, PorB o RmpM) está cadena arriba del gen diana. Como un ejemplo, el promotor PorA puede ser optimizado para expresión tal como lo describe van der Ende y col. Infect Immun 2000;68:6685-90. La inserción del promotor puede lograrse, por ejemplo, a través de amplificación por PCR del segmento cadena arriba del gen NMB0964 diana, clonación del segmento cadena arriba en un vector, y ya sea

inserción de sitios de restricción adecuados durante amplificación por PCR, o uso de sitios de restricción que ocurren naturalmente para insertar el segmento de promotor PorA. Por ejemplo, se puede clonar un segmento cadena arriba de aproximadamente 700 pb del gen NMB0964. Usando sitios de la enzima de restricción que ocurre naturalmente localizados a una distancia adecuada (por ejemplo, aproximadamente 400 pb) cadena arriba del promotor NMB0964 dentro de este segmento clonado, se inserta un segmento de promotor PorA. Se puede insertar un cartucho de resistencia a antibióticos (por ejemplo, eritromicina) dentro del segmento más cadena arriba del promotor PorA, y la construcción puede ser usada para reemplazar el segmento NMB0964 cadena arriba tipo silvestre por recombinación homóloga.

Otro procedimiento implica introducir una secuencia de codificación de polipéptido NMB0964 cadena arriba de un promotor endógeno que exhibe actividad de transcripción fuerte en el genoma de la célula huésped. Por ejemplo, la región de codificación del gen RmpM puede ser reemplazada por una secuencia de codificación de un polipéptido NMB0964. Este procedimiento aprovecha el promotor RmpM constitutivo altamente activo, para conducir la expresión.

Las cepas de *Neisseria* pueden ser modificadas genéticamente para sobre-expresar NMB0964 mediante la introducción de una construcción que codifica un polipéptido NMB0964 en una célula huésped de *Neisseria*. El NMB0964 introducido para la expresión es referido en la presente invención como un NMB0964 "exógeno". La célula huésped produce un NMB0964 endógeno, el NMB0964 exógeno puede tener la misma o una diferente secuencia de aminoácidos en comparación con NMB0964 endógeno.

Los polipéptidos NMB0964 útiles en la presente invención, también incluyen proteínas de fusión, en donde la proteína de fusión comprende un polipéptido NMB0964 que tiene un compañero de fusión en su extremo N o extremo C. Los compañeros de fusión de interés incluyen, por ejemplo, glutatión S transferasa (GST), proteína de enlace de maltosa (MBP), marcador His, y similares, así como péptidos líder de otras proteínas.

Se puede determinar la identidad de secuencia usando procedimientos para alineación y comparación de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, en donde los procedimientos son bien conocidos en la técnica. La comparación de secuencias más largas puede requerir procedimientos más sofisticados para lograr la alineación óptima de dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación, se puede llevar a cabo a través del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, a través del algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J Mol. Biol. 48:443, a través de un procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444, a través de implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da como resultado el porcentaje más alto de similitud de secuencia con respecto a la ventana de comparación) generada a través de los diversos procedimientos.

Se puede llevar a cabo una alineación óptima de secuencias para comparación, por ejemplo, a través del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), a través del algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), a través del procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), a través de implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BBSTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (ver de manera general, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel y col., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son algoritmos BLAST y BLAST 2.0, los cuales se describen en Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschuel y col. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 33 89-3402, respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible en el Centro Nacional de Información de Biotecnología (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero los pares de secuencia con una alta calificación (HSPs), identificando palabras de poca longitud. W en la secuencia de consulta, que coincide o satisface alguna calificación T de puntuación de umbral con valor positivo, cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T es referido como la puntuación de umbral de la calificación de la palabra vecina (Altschul y col, mencionado anteriormente).

Estos aciertos de la palabra vecina inicial, actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largas que los contienen. Los aciertos de las palabras posteriormente se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementar la calificación de alineación acumulativa. Se calculan las calificaciones acumulativas usando, para secuencias de nucleótido, los parámetros M (calificación de recompensa para un par de residuos de acoplamiento; siempre > 0) y N (calificación de penalización para residuos de desacoplamiento; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de calificación para calcular la calificación acumulativa. La



- extensión de los aciertos de la palabra en cada dirección son obstaculizados cuando: la calificación de la alineación acumulativa baja una cantidad X a partir de su máximo valor logrado; la calificación acumulativa va a cero o menor, debido a la acumulación de una o más alineaciones del residuo de calificación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótido), usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de calificación BLOSUM62 (ver la Publicación de Henikoff y Henikoff, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).
- Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad a través de la cual puede ocurrir, por casualidad, un acoplamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia, es menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01, y lo más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.
- Una indicación adicional de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos comparten identidad de secuencia, es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, tiene reactividad cruzada inmunológica con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, tal como se describe más adelante.
- Por lo tanto, un polipéptido comparte normalmente una identidad de secuencia con un segundo polipéptido, por ejemplo, en donde los dos polipéptidos difieren únicamente por sustituciones conservadora. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico comparten identidad de secuencia, es que las dos moléculas se hibridan entre sí bajo condiciones estrictas. La selección de un grupo particular de condiciones de hibridación se selecciona siguiendo procedimientos estándar en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Un ejemplo de condiciones de hibridación estrictas es hibridación a una temperatura de 50 °C o mayor y 0,1 x SSC (15 mM de cloruro de sodio/1,5 mM de citrato de sodio). Otro ejemplo de condiciones de hibridación estrictas es incubación durante la noche a una temperatura de 42 °C en una solución: % de formamida, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 nM de citrato de trisodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH7,6), solución de 5 x Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, cortado, seguido de lavado de los filtros en 0,1 x SSC a una temperatura de aproximadamente 65 °C.
- Las condiciones de hibridación estrictas son condiciones de hibridación que son al menos tan estrictas como las condiciones representativas anteriores, en donde las condiciones se consideran como al menos tan estrictas como si fueran al menos aproximadamente el 80 % de rigurosidad, normalmente al menos aproximadamente 90 % de rigurosidad de las condiciones estrictas específicas. Otras condiciones de hibridación estrictas son conocidas en la técnica y se pueden emplear para identificar ácidos nucleicos de esta modalidad particular de la presente invención.
- Preferentemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácido conservadoras. Las sustituciones de aminoácido conservadoras se refieren a la capacidad de intercambio de los residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales hidroxilo-alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadora preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.
- Los procedimientos y composiciones que pueden ser fácilmente adaptados para proporcionar modificación genética de una célula huésped de *Neisseria* para expresar un polipéptido NMB0964 exógeno son conocidos en la técnica. Los vectores y procedimientos de ejemplo son proporcionados en el documento WO 02/09746 y en el documento O'Dwyer y col. Infect Immun 2004;72:651 1-80.
- Los procedimientos para transferir un material genético en un huésped *Neisseria*, incluyen, por ejemplo, procedimientos de conjugación, transformación, electroporación, de fosfato de calcio y similares. El procedimiento de transferencia debe proporcionar la expresión estable de ácido nucleico que codifica NMB0964. El ácido nucleico que codifica NMB0964 puede ser proporcionado como un elemento episomal heredable (por ejemplo, plásmido) o puede estar genómicamente integrado.

Los vectores adecuados variarán en la composición dependiendo de qué tipo de evento de recombinación sea llevado a cabo. Los vectores de integración pueden ser plásmidos suicidas o de réplica condicional, bacteriófagos, transposones o fragmentos de ADN lineal obtenidos mediante hidrólisis de restricción o amplificación por PCR. La selección del evento de recombinación se puede lograr por medio de un marcador genético seleccionable tal como genes que confieren resistencia a antibióticos (por ejemplo kanamicina, eritromicina, cloranfenicol, o gentamicina), genes que confieren resistencia a metales pesados y/o compuestos tóxicos o genes que complementan mutaciones auxotróficas (por ejemplo pur, leu, met, aro).

En una modalidad, el vector es un vector de expresión basado en plásmidos episomales que contienen marcadores de resistencia a fármacos seleccionables que se replican en forma autónoma tanto en *E. coli* como en *N. meningitidis*. Un ejemplo de dicho "vector lanzadera" es el plásmido pFP10 (Pagotto y col. Gene 2000 244:13-19).

## INMUNIZACIÓN

En general, los procedimientos de la invención proporcionan administración de una o más composiciones antigénicas de la invención a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) para provocar una respuesta inmune protectora contra más de una cepa de la especie de bacteria de *Neisseria*, y por lo tanto protección contra una enfermedad originada por dicha bacteria. En particular, los procedimientos de la presente invención, pueden proporcionar una respuesta inmune inmunoprotectora contra 1, 2, 3, 4, o más cepas de la especie *Neisseria meningitidis*, en donde las cepas difieren en al menos un serogrupo, serotipo o serosubtipo, o polipéptido NMB0964. De particular interés es la inducción de una respuesta inmune protectora contra múltiples cepas de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B, particularmente cuando las cepas difieren en serosubtipo (por ejemplo, tienen PorAs heterólogo). También de particular interés es la inducción de una respuesta inmune protectora contra cepas que son heterólogas entre sí, en términos de PorA y/o NMB0964.

Las composiciones antigénicas de la invención, se pueden administrar en forma oral, nasal, nasofaríngea, parenteral, entérica, gástrica, tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, en forma de comprimido, sólido, polvo, líquido, aerosol, en forma local o sistémica, con o sin excipientes agregados. Los procedimientos reales para preparar composiciones que se puedan mezclar en forma parenteral son conocidos o evidentes para los expertos en la técnica, y se describen con mayor detalle en Publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1980).

Se reconoce que la administración oral puede requerir la protección de la digestión de las composiciones. Esto se logra normalmente ya sea mediante asociación de la composición con un agente que la hace resistente a hidrólisis ácida y enzimática, o mediante empaquetamiento de la composición en un transportador adecuadamente resistente. En la técnica son bien conocidos medios para protección de la digestión.

Las composiciones se administran a un animal que está en riesgo de adquirir una enfermedad de *Neisseria* para evitar o al menos detener parcialmente el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades efectivas para uso terapéutico dependerán, por ejemplo, de la composición antigénica, la forma de administración, el peso y estado general de la salud del paciente, y el juicio del médico que prescribe. Las dosis simples o múltiples de las composiciones antigénicas pueden ser administradas dependiendo de la dosis y frecuencia requerida, y toleradas por el paciente y ruta de administración.

Las composiciones antigénicas (también conocidas en la presente invención como composiciones inmunogénicas) aquí descritas, pueden comprender una mezcla de vesículas pudiendo dichas vesículas ser de la misma cepa o cepas diferentes. En otra modalidad, las composiciones antigénicas pueden comprender una mezcla de vesículas de 2, 3, 4, 5 o más cepas.

Las composiciones antigénicas se administran en una cantidad efectiva para provocar una respuesta inmune, particularmente una respuesta inmune humoral, en el huésped. Las cantidades para inmunización de la mezcla generalmente fluctúan de aproximadamente 0,001 mg hasta aproximadamente 1,0 mg por paciente de 70 kilogramos, más comúnmente de aproximadamente 0,001 mg hasta aproximadamente 0,2 mg por paciente de 70 kilogramos. Las dosis de 0,001 hasta aproximadamente 10 mg por paciente por día, pueden ser usadas, particularmente cuando se administra el antígeno a un sitio aislado y no dentro del torrente sanguíneo, tal como dentro de una cavidad corporal o dentro del lumen de un órgano. Son posibles dosificaciones sustancialmente mayores (por ejemplo 10 a 100 mg o más) en administración oral, nasal, o tópica. La administración inicial de la mezcla puede estar seguida de inmunización de refuerzo de la misma o una mezcla diferente, prefiriéndose al menos un refuerzo, más normalmente dos refuerzos.

Las composiciones de antígeno se administran normalmente a un mamífero que es inmunológicamente vírgenes con respecto a *Neisseria*, particularmente con respecto a *Neisseria meningitidis*. En una modalidad particular, el mamífero es un niño humano de aproximadamente 5 años o más pequeño, y preferentemente de aproximadamente 2 años o más pequeño, y las composiciones de antígeno se administran de cualesquiera de uno o más de los siguientes tiempos: 2 semanas, 1 mes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 meses, o 1 año, o 15, 18 o 21 meses después del nacimiento, o a los 2, 3,

4 o 5 años de edad.

En general, la administración a cualquier mamífero se inicia preferentemente antes del primer signo de los síntomas de la enfermedad, o al primer signo de una posible o real exposición a *Neisseria*.

### Ejemplos

- 5 Quedará entendido que los ejemplos y modalidades aquí descritos son únicamente para propósitos ilustrativos y que a los expertos en la técnica se les ocurrirá diversos cambios o modificaciones a la luz de las mismas, y estarán incluidos dentro del espíritu y alcance de la presente solicitud y ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

#### Ejemplo 1

##### Inmunogenicidad de OMVs con regulación positiva de Tdfl

- 10 Tdfl es un gen que se cree que se expresa cuando *N. meningitidis* está dentro de la sangre. Por consiguiente no es expresado normalmente cuando las cepas se cultivan en un medio de cultivo convencional, aunque la cepa H44/76 tipo silvestre, por ejemplo, puede elaborarse para expresar la proteína en condiciones de cultivo especiales (medio de cultivo RPMI expresado con hemina). El siguiente experimento detalla el uso de una cepa H44/76 en donde la expresión de Tdfl ha sido hecha inducible en forma recombinante (a través el uso de IPTG). Esto permite la sobre-expresión de Tdfl en la superficie de vacunas OMV elaboradas de la cepa, y proporciona una forma fácil para cultivar una cepa que exprese el antígeno para establecer si las condiciones generadas contra Tdfl tienen la capacidad de exterminar una cepa modificada que expresa Tdfl bajo condiciones de cultivo normales (+IPTG). El impacto de IPTG en la expresión de Tdfl en células usadas en SBA se muestra en la figura 7.

- 20 Se inmunizaron grupos de 10 ratones tres veces con OMV mediante la ruta intramuscular los días 0, 21 y 28. Cada inoculación se realizó de hasta 5 µg (contenido de proteína) de OMVs formulado en AIPO4 con MPL. Los OMVs se derivaron de la cepa *Neisseria meningitidis* H44/76, se construyeron de modo que se regularan negativamente los polisacáridos capsulares y PorA y el inmunotipo LOS fuera del tipo galE. Se realizó una comparación de OMVs en donde Tdfl fue o no regulada positivamente (regulación positiva bajo el control del promotor inducible IPTG). El día 42, las muestras de sangre se tomaron para análisis mediante un ensayo bactericida de suero usando la cepa homóloga H44/76 (B:15:P1.7,16) que exprese o no Tdfl (después de la adición o no de IPTG en el medio de cultivo).

- 25 Las cepas de *N. meningitidis* se cultivaron durante la noche en GC-agar con Placas de Petri con 10 µg/ml de cloranfenicol a 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>. Se subcultivaron durante 3 horas en un medio TSB líquido suplementado o no con IPTG 1000 µM. Los sueros individuales fueron desactivados durante 30 minutos a una temperatura de 56 °C. Las muestras de suero fueron diluidas en HBSS-BSA 0,5 % y posteriormente fueron diluidas al doble (8 diluciones) en un volumen de 25 µl en microplacas de fondo plano. Las bacterias fueron diluidas en HBSS-BSA 0,5 % para producir 8.10<sup>3</sup> UFC/ml y 12,5 µl de esta dilución fue agregada a la dilución de suero. También se agregó a cada pocillo complemento de conejo (12,5 µl). Después de 75 minutos de incubación a una temperatura de 37 °C bajo agitación, se dispersaron 15 µl de la mezcla en placas de GC-agar calentadas previamente, incubadas durante la noche a 37 °C +CO<sub>2</sub>.

- 35 Se contaron las UFC y se calculó el porcentaje de exterminio. El título de SBA es la dilución que proporciona el 50 % de exterminación.

Títulos de SBA: impacto de expresión de Tdfl mediante células diana

	Títulos de SBA
H44/76 sin IPTG	< 50
H44/76 con IPTG	400; 400; 800

Sin IPTG, Tdfl no se expresa en células objetivo que no son exterminadas por suero procedentes de ratones inmunizados con OMVs Tdfl regulados positivamente. Cuando la expresión de Tdfl se induce específicamente mediante IPTG, las células diana expresan Tdfl y son exterminadas mediante el suero de ratones anti-OMVs Tdfl.

- 40 **Ejemplo 2: Proteína de membrana externa regulada por zinc, novedosa, en *Neisseria meningitidis* con potencial de vacuna**

#### SÍNTESIS

Ya que la concentración de hierro libre en el huésped humano es baja, los mecanismos de adquisición de hierro eficientes constituyen factores de virulencia importantes para bacterias patógenas. En la bacteria Gram-negativa, los

receptores de membrana externa dependientes de TonB están implicados en la adquisición de hierro. Sin embargo, el transporte a través de la membrana externa bacteriana de otros metales, los cuales también son escasos en el huésped humano, es todavía menos claro. En este estudio se caracterizó un receptor dependiente de TonB novedoso en *Neisseria meningitidis*. Se mostró que la bacteria produce esta proteína bajo una limitación de zinc, y que está implicada en la captación de zinc. Además, ya que la proteína es altamente conservada entre aislados, y tiene la capacidad de inducir anticuerpos bactericidas, constituye un candidato novedoso para el desarrollo de una vacuna contra *N. meningitidis* para la cual no está disponible una vacuna universal efectiva hasta la fecha. Los homólogos de la proteína, designados como TfdI, se encuentran en muchos otros patógenos que residen en el tracto respiratorio, lo que sugiere que la captación de zinc transmitida por receptor es particularmente importante para la supervivencia en este nicho.

## 10 INTRODUCCIÓN

La envoltura celular de la bacteria Gram-negativa, consiste en 2 membranas, la membrana interna y la externa, que están separadas por el periplasma que contiene la capa de peptidoglucano. La membrana externa forma una barrera para compuestos perjudiciales que proceden del ambiente. La mayoría de los nutrientes pueden pasar la membrana externa mediante difusión pasiva a través de proteínas de membrana externa abundantes que forman un canal, colectivamente llamadas porinas. Sin embargo, la difusión no es una opción cuando es baja la concentración extracelular de un nutriente. Este es el caso, por ejemplo, del hierro. Los patógenos se enfrentan a bajas concentraciones de hierro libre dentro del huésped humano, en donde el hierro es enlazado mediante proteínas de transporte y almacenamiento de hierro, tal como lactoferrina y transferrina. De ahí, que los mecanismos de adquisición de hierro eficientes constituyan importantes factores de virulencia y hayan sido estudiados extensamente en muchos patógenos (1, 2).

Cuando crece bajo condiciones limitadas en hierro, la bacteria Gram-negativa induce la síntesis de proteínas de membrana externa que funcionan como receptores para las proteínas de enlace de hierro del huésped, para hemo, o para sideróforos, que son compuestos de quelación de hierro pequeños producidos y secretados por la bacteria bajo limitación de hierro. Las estructuras de cristal resueltas de dichos receptores revelaron barriles- $\beta$  de 22 hebras, que no forman canales abiertos sino que están cerrados por un dominio de tapón N-terminal (3). Después del enlace del ligando al receptor, la captación subsecuente es un proceso activo que requiere energía del gradiente de protón a través de la membrana interna, que se acopla a los receptores en la membrana externa a través de un complejo de tres proteínas, el complejo TonB (4, 5).

Aunque los mecanismos de adquisición de hierro han sido estudiados extensamente en muchas bacterias Gram-negativas, poco se sabe aún con respecto al transporte de otros metales pesados esenciales, tales como zinc y manganeso, a través de la membrana externa bacteriana. La concentración de estos oligoelementos también es baja en el huésped humano, el cual, por ejemplo, responde a infecciones a través de la producción de metalotioneínas y calprotectina, reduciendo de esta forma la disponibilidad de los metales a los patógenos invasivos (6, 7). Por consiguiente, los patógenos Gram-negativos poseen probablemente mecanismos de adquisición efectivos para estos metales, que pueden o no parecerse a los sistemas de adquisición de hierro.

*Neisseria meningitidis* es un patógeno humano obligado que puede colonizar en forma asintomática la mucosa nasofaríngea. Ocasionalmente la bacteria entra al torrente sanguíneo y puede originar meningitis y sepsis con una alta tasa de mortalidad (8). Aunque las vacunas están disponibles para la mayor parte de los serogrupos patógenos de *N. meningitidis* con base en los polisacáridos capsulares, carecemos de una vacuna contra meningococos de serogrupo B. La cápsula de polisacárido de las cepas de serogrupo B es deficientemente inmunogénica debido a su parecido a las glucoproteínas (9). Por lo tanto, los antígenos subcapsulares están siendo estudiados como componentes de vacuna alternativos; sin embargo, estos estudios se ven frustrados por la alta variabilidad antigénica de las proteínas de membrana externa mayores. Por consiguiente, se ha cambiado la atención a antígenos menores, incluyendo los receptores dependientes de TonB.

Cuando se cultiva bajo limitación de hierro, *N. meningitidis* produce receptores dependientes de TonB para lactoferrina (10), transferrina (11), hemoglobina (12, 13) y enterobactina (14), todas implicadas en la captación de hierro. Con base en búsquedas de homología, Turner y col (15) identificó siete genes adicionales para los miembros de la familia putativa dependiente de TonB (Tdf) en las secuencias de genoma disponibles de tres cepas de *Neisseria*. En forma interesante, parece no afectada la expresión de algunos de estos genes *tdf* por la disponibilidad de hierro en diversos estudios de micromatrices (16, 17), indicando que sus productos podrían estar implicados en el transporte de metales, además de hierro. Aquí estudiamos la regulación de la síntesis, la función y el potencial de la vacuna de uno de estos receptores, y se muestra que este receptor está implicado en la captación de zinc.

## RESULTADOS

### Tdfl no es un receptor de hemo

Se identificó previamente Tdfl (etiquetas de locus NMA1161 y NMB0964 en los genomas secuenciados de la cepa Z2491 del serogrupo A y la cepa MC58 del serogrupo B de *N. meningitidis*, respectivamente) como uno de siete receptores dependientes de TonB putativos novedosos presentes en los genomas de *Neisseria* (15) y se encontró que estaba regulado positivamente en la presencia de suero humano virgen (18). Ya que casi todos los receptores dependientes de TonB estudiados hasta la fecha están implicados en la adquisición de hierro, se asume que Tdfl transporta un complejo de hierro. Esta idea fue reforzada por el hecho de que las búsquedas blast (19) con la secuencia de aminoácidos de NMA1161, revelaron alta similitud de secuencia con receptores de membrana externa para la captación de hemo, tal como HumA de *Moraxella catarrhalis* (20) con 41 % de identidad y 58 % de similitud.

Para evaluar la función de Tdfl, construimos un mutante de eliminación *tdfl* de un derivado no encapsulado de la cepa H44/76 de serogrupo B llamado HB-1. Se encontró un enlace similar de hemo a HB-1 y el mutante *tdfl* tal como se evalúa mediante análisis de transferencia puntual y la cepa de mutante *tdfl* aún puede crecer en placas con hemo como la única fuente de hierro. Tampoco se pudo encontrar enlace hemo incrementado mediante células *Escherichia coli* que expresan Tdfl. Tampoco se pudo complementar una auxotrófo de hemo de *E. coli* (datos no mostrados). Por consiguiente, se hipotetiza que Tdfl, aunque homólogo para receptores hemo, no funciona como un receptor hemo.

### Regulación de *tdfl* mediante zinc

Ya que Tdfl no es un receptor hemo y no se encuentra que está regulado por hierro, se buscaron condiciones en donde se pudo detectar *tdfl* como expresión en H44/76 *Neisseria meningitidis* HB-1 con deficiencia de cápsula. Nunca se pudo detectar Tdfl en transferencias de Western cuando las bacterias se cultivaron en caldo de soja triptico (TSB), un medio con alto contenido de complejo (figura 1A, columna 1). Sin embargo, cuando las bacterias se cultivaron en el medio RPMI definido en forma química, Tdfl fue detectable en lisados bacterianos (figura 1A, columna 2). Se demostró la especificidad de la señal detectada, a través de su ausencia en la cepa de eliminación de *tdfl* cultivada en RPMI (figura 1A, columna 3). Observamos que la presencia de cantidades incluso pequeñas de TSB agregadas a RPMI, afectó en forma negativa a la síntesis de Tdfl (figura 1B); aparentemente TSB contiene un compuesto que reprime la transcripción de *tdfl*. Ya que se observó que RPMI no contiene una fuente de metales de residuo, se decidió probar si la adición de un cóctel de metales traza, que contiene cobalto, molibdeno, manganeso, cobre y zinc, puede reprimir la expresión de *tdfl*, lo cual de hecho parece ser el caso. Posteriormente se probaron todos estos metales por separado, y se encontró que específicamente el zinc, incluso en concentraciones sub- $\mu\text{M}$ , originó una represión de la expresión de *tdfl* (figura 1 C). Ya que el RPMI estándar no es suplementado con una fuente de zinc específica, el zinc disponible requerido para el crecimiento bacteriano presumiblemente viene del agua y/o residuos en las sales usadas para elaborar el medio. Se midió la concentración de zinc en un medio RPMI, mediante espectrometría de masa de plasma acoplada en forma inductiva (ICP-MS) y se encontró que es de  $\sim 110$  partes por billón ( $\sim 1,69 \mu\text{M}$ ).

La regulación de zinc de *tdfl* se volvió incluso más evidente cuando se suplementó el medio RPMI con el quelador de zinc específico N,N,N',N'-Tetrakis-(2-piridilmetil)-Etilendiamina (TPEN). La adición de TPEN al medio dio como resultado un incremento dependiente de la dosis en la síntesis de Tdfl (figura 1 D). Sin embargo, las concentraciones superiores a  $1 \mu\text{M}$  TPEN inhibieron totalmente el crecimiento celular, presumiblemente debido a la eliminación de zinc total del medio. El crecimiento puede ser restaurado mediante la adición de zinc (datos no mostrados). La regulación de zinc de *tdfl*, fue confirmada mediante PCR cuantitativa de tiempo real (RT-qPCR) usando ARN total obtenido de cultivos crecidos en RPMI suplementado con o sin  $500 \text{ nM}$  de zinc o  $0,5 \mu\text{M}$  de TPEN. Los datos mostraron una represión de 13,8-veces en la presencia de zinc y 3,8-veces de regulación positiva en la presencia de TPEN. La diferencia en veces entre TPEN y zinc agregado, fue de 52,6 veces.

### Función del regulador de transcripción Zur en la expresión de *tdfl*

En *E. coli*, el regulador de captación de zinc (Zur) ha mostrado regular la expresión de los genes *znuACB*, que codifican la proteína de enlace periplásmico, la ATPasa y el componente de membrana interna integral requerido para el transporte de zinc procedente desde el periplasma hasta el citoplasma (23). En la presencia de zinc, Zur enlaza un elemento de enlace a Zur (GAAATGTTATANTATAACATTTTC de consenso) en el promotor del operón *znuACB* y por lo tanto bloquea la transcripción.

En la secuencia de genoma de la cepa *N. meningitidis* MC58, se identificaron homólogos del gen *zur* de *E. coli*, por ejemplo NMB1266, y de *znuCBA*, es decir, NMB0588, NMB0587, y NMB0586. Además, encontramos secuencias que se asemejan al consenso de enlace de Zur de *E. coli* en las regiones cadena arriba de *tdfl* neisserial (GtAAATGTTATATAATAAC Aaact) y *znuC* (cAAAcGTTATACagTAtCATaTC) (los nucleótidos idénticos al consenso de *E. coli* están con letras mayúsculas). Para confirmar la implicación de Zur en la regulación de expresión de *tdfl*, generamos un mutante *zur* de la cepa HB-1, que, de hecho, produjo Tdfl en forma constitutiva (figura 2). Asimismo, RT-qPCR

demonstró la implicación de Zur en la expresión de *znuA* y *tdfl* ya que los niveles de expresión de *znuA* y *tdfl* incrementaron 5 y 34 veces, respectivamente, en el mutante *zur* en comparación con su cepa de origen ambos crecieron en la presencia de zinc.

#### Tdfl facilita la adquisición de zinc

5 Ya que la expresión de *tdfl* se regula a través de la disponibilidad de zinc, es probable que Tdfl actúe como un receptor para zinc o un complejo que contiene zinc. Se analizó primero la secuencia de aminoácidos y se construyó un modelo de topología de Tdfl usando el programa PROFmb en el sitio [www.rostlab.org](http://www.rostlab.org), (figura 3). Tdfl contiene dos residuos de cisteína en el lazo extracelular putativo L3. Si estas cisteínas forman un enlace de disulfuro (soportado por nuestro análisis de la fracción de membrana de bacteria mediante SDS-PAGE con y sin DTT, en donde la incubación de la muestra con el agente de reducción dio como resultado un cambio en la movilidad electroforética, presumiblemente debido a la interrupción del enlace de disulfuro) llevan dos tramos de los residuos de aminoácido, ambos con alto contenido en residuos de histidina y ácido aspártico, en proximidad cercana (figura 3), lo cual puede ser de importancia funcional, ya que también en la proteína periplásmica ZnuA de *E. coli*, está implicado un tramo de los residuos His y Asp en el enlace de zinc (25). Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que Tdfl enlace a zinc libre, y lo transporta al periplasma. Para probar esta hipótesis, primero se determinó si Tdfl puede enlazar a zinc. Comparamos vesículas de membrana externa con o sin Tdfl por su capacidad de competir con 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) para zinc. Las vesículas de membrana externa que contienen Tdfl mostraron ~40 % de enlace incrementado de zinc en comparación con vesículas sin Tdfl (figura 4A). Para probar el transporte de zinc, comparamos la eliminación de *tdfl*, una eliminación de *tonB* y su cepa de origen para la acumulación de zinc intracelular usando ICP-MS. HB-1 acumuló ~33 % más de zinc que el mutante *tdfl* o el mutante *tonB*, indicando que Tdfl transporta zinc libre y que este transporte necesita del sistema TonB (figura 4B).

Si de hecho Tdfl está implicado en la captación de zinc libre, se puede esperar que ocurra la eliminación de represión de la expresión del gen *znu* en mayores concentraciones de zinc externo en el mutante *tdfl* en comparación con la cepa tipo natural. Para probar esta idea, se cultivó el mutante *tdfl* y la cepa de origen en un medio RPMI con 500 nM de zinc adicional, el cual en gran parte, pero no completamente, reprime la expresión de *tdfl* en la cepa tipo silvestre (figura 1 C). Medimos en forma subsecuente los niveles relativos de mRNA de *tdfl* y *znuA* mediante RT-qPCR. El mutante *tdfl* aún contiene los primeros 437 nucleótidos del gen *tdfl* que fueron usados para la detección de la expresión de gen. En el mutante *tdfl*, hubo 18,6-veces más de *tdfl* y 7,4-veces más de *znuA* expresado, mostrando que de hecho, la concentración de zinc intracelular en el mutante *tdfl* es menor que la que está en la cepa de origen bajo condiciones de crecimiento aplicadas. Asimismo una cepa de eliminación *znuA* expresó altos niveles de Tdfl en la presencia de zinc, confirmando que se requiere ZnuA para sostener niveles de zinc suficientes en la célula (figura 4C). Por lo tanto, tanto Tdfl como ZnuA están implicados en el transporte de zinc.

#### Conservación de Tdfl

Además de la función f de Tdfl, también se desea investigar si Tdfl es un candidato de vacuna para una vacuna de *N. meningitidis* universal. Uno de los criterios es que el antígeno tiene que ser conservado. Miramos primero en los genomas de *N. meningitidis* disponibles y encontramos que Tdfl tiene una sorprendente identidad de aminoácido del 97 % al 99 % de la proteína madura (figura S1). Las diferencias en secuencias son dispersadas en la proteína y no se aglomeran en las regiones de lazo extracelular anticipadas, las cuales con frecuencia son antigénicamente variables en las proteínas de membrana externa de *Neisseria* (figura S1). Analizamos en forma subsecuente la presencia de Tdfl en un panel de 32 diferentes aislados de *N. meningitidis* de diferentes serogrupos y diferentes linajes clonales. Cada cepa fue cultivada en un medio RPMI suplementado o no con 500 nM de zinc y analizado mediante transferencia de Western con el antisuero elevado contra Tdfl de H44/76. Todas las cepas mostraron una represión de Tdfl en la presencia de zinc (figura 5).

Posteriormente se desea conocer la homología de Tdfl con otras bacterias patógenas. Se comparó primero Tdfl con *N. gonorrhoea* y se encontró una identidad del 96 % y una similitud del 97 % entre estas dos cepas de *Neisseria*. Posteriormente, se usó el programa blast en NCBI con un corte del 40 % de identidad en el nivel de aminoácido para buscar homólogos de Tdfl en otras bacterias patógenas. Identificamos homólogos en otras bacterias patógenas, incluyendo *M. catarrhalis*, *Haemophilus parasuis*, *Mannheimia haemolytica*, *Acinetobacter baumannii*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella pertussis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, promediando una identidad del 41 % y una similitud del 59 % en el nivel de aminoácido y todos los homólogos Tdfl tienen la región His/Asp (figura S2). En forma interesante, en *B. pertussis* el homólogo *tdfl* se localiza en forma adyacente al homólogo de los genes *znuABC* y *zur*, indicando nuevamente una relación funcional entre estos genes. Además, todos estos homólogos Tdfl contienen tramos con alto contenido de His- y Asp- (figura S2).

### Tdfl induce anticuerpos bactericidas

Para investigar el potencial de vacuna de Tdfl, se inmunizaron ratones con vesículas de membrana externa de *Neisseria* que contienen niveles de sobre-expresión de esta proteína (figura 6A) y se probaron los sueros resultantes con respecto a la presencia de anticuerpos bactericidas. En forma rutinaria, llevamos a cabo ensayos bactericidas de suero en bacterias desarrolladas en un medio TSB; sin embargo, bajo estas condiciones *tdfl* no se expresa. Por consiguiente, probamos el suero con respecto a la actividad bactericida en una cepa que expresó Tdfl de un promotor inducible mediante  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) y se compararon cultivos crecidos con y sin IPTG. Los títulos bactericidas de los sueros fueron <1:100 cuando IPTG estuvo ausente, pero 1:1042 cuando IPTG estuvo presente durante el crecimiento de la bacteria. Los títulos en sueros pre-inmunes también fueron <1:100. Estos datos muestran claramente que Tdfl tiene la capacidad de provocar anticuerpos bactericidas. También se desea investigar si son suficientes los niveles de expresión de *tdfl* codificados por cromosoma normal, para mediar una exterminación transmitida por complemento. Para esto se empleó la cepa de eliminación de *zur* que produce en forma constitutiva Tdfl en el medio TSB, y crece en forma comparable a la cepa tipo silvestre en este medio.

### DISCUSIÓN

El sistema de captación de ZnuABC de alta afinidad para zinc, ha sido identificado previamente en *N. gonorrhoeae* (30). Los homólogos pueden encontrarse en el genoma meningocócico, tal como se describe anteriormente, y en los genomas de muchas otras bacterias. En *Salmonella enterica* este transportador ABC ha estado asociado con virulencia (31). En ningún caso, un receptor de membrana externa implicada en la adquisición de zinc ha sido identificado y se considera que el zinc se difumina a través de las porinas.

Sin embargo, en el huésped humano, los niveles de zinc libres probablemente son demasiado bajos para sostener el crecimiento bacteriano mediante difusión pasiva. La cantidad total de zinc en el suero humano es de aproximadamente 19  $\mu$ M, aunque la vasta mayoría es enlazada por proteínas de suero tal como albúmina (32). Aquí se ha identificado un receptor de membrana externa, Tdfl que es regulado mediante zinc. La adición de 700 nM de zinc al medio de crecimiento reprimió completamente la expresión de Tdfl. La función de Tdfl, es enlazar y transportar el zinc no enlazado (libre). Se anticipa que el zinc es enlazado inicialmente por el tramo His/Asp en el lazo externo y posteriormente internado a través de dos histidinas que están en la parte superior del dominio de tapón (figura 3b). Un posible papel para el sistema TonB en la captación de zinc, es que extrae el tapón fuera del barril y con este movimiento el zinc enlazado a los dos residuos His, es transportado en el periplasma, donde es captado por la proteína ZnuA de enlace periplásmico.

Resulta interesante que se informara sobre una regulación similar de expresión de *tdfl* y *znuA* en un estudio de micromatriz que usa *N. gonorrhoeae* (33). El homólogo *tdfl* NGO1205 y el homólogo *znuA* NGO0168 fueron regulados positivamente en un mutante que carece del gen NGO0542. Este gen fue anotado en dicho estudio como *perR*, debido a su homología con un regulador que responde a peróxido dependiente de manganeso, encontrado en organismos gram-positivos (34). Sin embargo, este es el mismo gen que se ha indicado como *zur*. La anotación *zur* es claramente más precisa, debido a que se muestra una regulación idéntica a través de la ausencia de *zur* o la ausencia de zinc. Viene mayor evidencia de la anotación *zur* en lugar de *perR* del mismo estudio en *N. gonorrhoeae*. Las microformaciones llevadas a cabo con el mutante *perR* gonocócico, mostraron regulación positiva también de las proteínas ribosomales L31 y L36. Los genomas de *Neisseria* contienen dos copias para cada uno de los genes que codifican estas proteínas conteniendo una forma de cada proteína un motivo de cinta de zinc. Se encontró que la disponibilidad del zinc es el factor clave que controla el tipo de proteína L31/L36 expresada en *B. subtilis* (34). En el mutante *perR* gonocócico, se induce la expresión específicamente de parálogos L31 y L36 que carecen de cinta de zinc, indicando fuertemente una regulación de zinc perturbada en un mutante *perR*. Además en otro estudio (17), se llevó a cabo una microformación para identificar la respuesta a la tensión oxidativa y ni a *perR* ni a cualquiera de los genes identificados en el estudio *PerR* (33), se les eliminó la represión y no se observó ningún efecto regulador del manganeso en la expresión de *tdfl* y *znuA*.

Previamente, se informó que la expresión de *tdfl* para ser inducida en la presencia del complemento activo (18). En este estudio de micromatrices, se compararon los perfiles de expresión de *N. meningitidis* desarrollada en la presencia de suero y suero desactivado por calor, y se encontró que Tdfl tiene una eliminación de represión de 23 veces en la presencia de suero no tratado. La relación entre la regulación de zinc y complemento, puede no ser obvia a primera vista. Una explicación posible para encontrar circuitos de regulación similar, puede ser que la bacteria en el estudio de matrices haya sido cultivada previamente en RMPI con BSA. Se sabe que la albúmina puede quelar zinc y, por consiguiente, las condiciones de crecimiento previo pueden haber sido gravemente limitadas en zinc. El tratamiento térmico de suero humano, liberarán zinc de la albúmina, reprimiendo de esta forma la expresión de *tdfl*. Esta explicación se refuerza por el hecho de que la expresión de Tdfl es inducida cuando se agrega a BSA al medio TSB durante crecimiento bacteriano (datos no mostrados).

Un estudio realizado por Hagen y Cornelissen (35) investigó si cualesquiera de las proteínas Tdf son esenciales para la supervivencia intracelular de *N. gonorrhoeae* en células epiteliales humanas. Los autores también probaron una eliminación de homólogo Tdfl (NG 1205), pero este mutante no fue afectado en la supervivencia intracelular.

5 La conservación de Tdfl es impactante; con una identidad del 98,6 % entre las cepas de *N. meningitidis* secuenciadas y una similitud del 99,2 % en el nivel de aminoácido de la proteína madura. Se encontró la proteína Tdfl en todos los meningococos probados, y todas las cepas mostraron expresión regulada por zinc de *tdfl*. Entre las proteínas Tdfl de las cepas meningocócicas y gonocócicas secuenciadas, existe el 96,1 % de identidad y el 97,3 % de similitud en el nivel de aminoácido. Las diferencias entre secuencias de Tdfl son dispersadas en la proteína y no se aglomeran en un lazo específico. Se encontró un promedio de identidad de aminoácido del 41 % de Tdfl con homólogos en otras bacterias, y en todos los casos se conservó el tramo His/Asp. Resulta intrigante que los homólogos de Tdfl fueron encontrados de manera particular en especies bacterianas que residen en el tracto respiratorio de seres humanos y animales. Posiblemente en las capas de mucosa del tracto respiratorio, la concentración de zinc no enlazada es demasiado baja para permitir una suficiente difusión pasiva a través de las porinas y por consiguiente Tdfl se vuelve esencial para el crecimiento y supervivencia bacteriano. Aunque Tdfl no es esencial para supervivencia intracelular (35), puede ser esencial en los fluidos corporales tipo suero y licor, en donde también puede ser muy baja la concentración de zinc libre. 10 15 Asimismo, no podemos descartar que Tdfl reconozca en forma adicional una forma compleja de zinc, que puede estar disponible en el tracto respiratorio, suero y/o en fluido cerebral.

Se ha mostrado en forma adicional que Tdfl puede inducir anticuerpos bactericidas en ratones, y que estos anticuerpos son dirigidos específicamente en Tdfl. Asimismo cuando se usó una bacteria que expresa Tdfl del locus cromosómico, se pudo detectar actividad bactericida, mostrando que, durante la infección, la concentración de antígeno es lo suficientemente alta para permitir el despeje de *N. meningitidis*. 20

El alto nivel de conservación y la posibilidad de elevar anticuerpos bactericidas específicos de Tdfl, hace a Tdfl un candidato de vacuna excelente.

#### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

25 Abreviaturas usadas: IPTG,  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida de isopropilo; PAR, 4-(2-piridilazo)resorcinol; RPMI, medio de Roswell Park Memorial Institute 1640; Tdf, familia dependiente de TonB; TPEN, N,N,N',N'-Tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina; TSB, caldo de soja triptico; ICP-MS, Espectrometría de masas de plasma acoplada en forma inductiva.

#### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

30 Las cepas de *Neisseria*, descritas en la figura 5, son de recolección de laboratorio. Excepto cuando se indica de otra forma, se llevaron a cabo experimentos con la cepa HB-1 y los mutantes de la misma. HB-1 es un derivado no encapsulado de la cepa H44/76 de serogrupo B (Bos y Tommassen, 2005). Se cultivó *N. meningitidis* sobre placas de GC agar (Oxoid) que contienen Vitox (Oxoid) y antibióticos cuando fue adecuado (kanamicina, 100  $\mu$ g/ml; cloranfenicol, 10  $\mu$ g/ml) en palmatorias a una temperatura de 37 °C. Se cultivaron cultivos líquidos en TSB (Difco) o en RPMI (Sigma) 35 en frascos de plástico a una temperatura de 37 °C con agitación. Se agregaron IPTG, zinc, y TPEN en las concentraciones indicadas. Se agregaron metales como un cóctel (340 nM ZnSO<sub>4</sub>, 160 nM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 800 nM MnCl<sub>2</sub>, 80 nM CoCl<sub>2</sub> y 80 nM CuSO<sub>4</sub> de concentración final) o como compuestos simples en las mismas concentraciones que el cóctel a menos que se indique de otra forma. Se agregó cloruro férrico como una concentración final de 8  $\mu$ M. Las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y TOP10F' (Invitrogen) fueron usadas para clonación de rutina y BL21(DE3) (Invitrogen) para expresión. Se usó un mutante *heniA* de *E. coli* para evaluar el transporte de hemo de Tdfl (22). Se propagó *E. coli* en un medio Luria-Bertani suplementado cuando era adecuado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, o 25  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. Para el hemo-auxótrofo C600 *hemAr::kan* (22) de *E. coli*, el medio fue suplementado con ácido 5-aminolevulínico. 40

#### Construcción de plásmidos y mutantes

45 Todos los cebadores fueron diseñados en la secuencia de genoma MC58 usando NMB0964 (*tdfl*), NMB1730 (*tonB*), NMN0586 (*znuA*), NMB1266 (*zur*).

Para una producción de proteína de alto nivel en *E. coli* el gen *tdfl* sin la parte que codifica la secuencia de señal, fue amplificado a partir de ADN cromosómico de la cepa H44/76 mediante PCR usando los cebadores 0964-F-GATCATATGCATGAAACTGAGCAATCGGTG- y 0964-R-GATGGATCCTTAAATCTTCACGTTACGCGGCC- que 50 llevan los sitios de restricción NdeI y BamHI, respectivamente (negritas). El producto resultante fue clonado en pCRII-TOPO de acuerdo con la recomendación del fabricante (Invitrogen), produciendo pCRII-*tdfl*, y subclonados en pET11a (Novagen) usando restricción NdeI/BamHI, dando como resultado el plásmido pET11a-*tdfl*.



Para obtener la construcción de eliminación de *tdff*, se amplificó un cartucho de gen de resistencia a kanamicina (36) mediante PCR con los cebadores Kan-R -TG**ACGCGT**CTCGACGCTGAGGTCTGC- y Kan-F -TG**TGTACAG**TCGACTTCAGACGGCCACG- y se clonó después de la digestión de MluI y BsrGI en pCRII-*tdff* digerido con las mismas enzimas. En la construcción resultante, pCKII-*tdff*::kan, el cartucho de resistencia a kanamicina sustituye la región entre los pb 437 y 1344 de *tdff*. Se usó pCRII-*tdff*::kan en un PCR con los cebadores 0964-R y 0964-F y el producto resultante fue usado para transformar HB-1 (37). Se probaron colonias resistentes a kanamicina para el reemplazo del gen correcto mediante PCR.

Todo el gen *tdff* de H44/76 fue amplificado con los cebadores Tdfl-F -GCAT**CATATGG**CACAACTACTCAAACCC- y Tdfl-R -AT**GACGTC**TTAAAACCTTCACGTTACGCCGCC- que contienen sitios de reconocimiento para NdeI y AatII (negritas), respectivamente. El producto PCR resultante fue clonado en pCRII-TOPO y subclonado en pEN11-pldA (36) usando los sitios de restricción NdeI y AatII. El plásmido resultante, pEN11-*tdff*, constituye un plásmido de réplica de *Neisseria* que contiene un gen *lac*<sup>Q</sup> y un promotor *lac/tac* tándem para la expresión controlada de *tdff*.

La construcción para generar una eliminación de *tonB* se elaboró amplificando fragmentos de ADN cadena arriba y cadena abajo del gen *tonB* usando los cebadores tonB-1 (GTACGATGATTGTGCCGACC), tonB-2 (ACTTTAAACTCC**GTCGACG**CAA**GTCGACT**GCGGGGGTTAA) con sitios de restricción Accl (negritas) para un fragmento, y tonB-3 (TTAACCCCGC**GTCGACT**TGCG**TGACG**AGTTAAAGT) con el sitio de restricción Accl (negritas) y tonB-4 (GCCATACTGTTGCGGATTTGA) para el otro fragmento. Los dos fragmentos cada uno fueron clonados en pCRII-TOPO y posteriormente ligados entre sí usando el sitio de restricción introducido Accl y el sitio SpeI en el vector pCRII-TOPO. Se usó en forma subsecuente el sitio Accl para clonar el gen de transacetilasa de cloranfenicol de pKD3 (38) previamente clonado en pCRII-TOPO mediante amplificación por PCR con cebadores que contienen un sitio Accl. La construcción resultante fue amplificada mediante PCR usando los cebadores tonB-1 y tonB-4 y este fragmento lineal fue usado para transformar *N. meningitidis* HB-1.

El gen *zur* fue eliminado siguiendo la misma estrategia. Se amplificaron los fragmentos cadena arriba y cadena abajo en este caso con los cebadores: zur-1 (TTCGCCGATGGCGGAATACA), zur-2 (CTTTCAGCGCAA**GTCGACT**CC**GTCGACG**CGTGCTGTTC) con el sitio de restricción Accl en letras negritas, zur-3 (GAACAGGCAC**GTCGACG**AG**TGCACT**TTGCGCTGAAAG) con el sitio de restricción Accl en letras negritas y zur-4 (TCCTATTGCGCAATACCCCC).

Se transformó un derivado *porA* de la cepa de *N. meningitidis* H44/76, llamado CE2001 (39) con pMF121, dando como resultado la eliminación de todo el locus de la cápsula y la producción de un lipopolisacárido con un centro externo truncado (36). Un plásmido derivado de pLAFR que contiene los genes *tonB*, *exbB* y *exbD* de *N. meningitidis* (13) se describió anteriormente.

#### SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western.

Los lisados celulares fueron preparados de bacterias desarrolladas durante 6 horas. Las células se diluyeron en DO<sub>600nm</sub> 1, se sedimentaron, e hirvieron en 100 µl de un tampón de muestra SDS-PAGE que contiene 2 % de SDS y 5 % de 2-mercaptoetanol. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE estándar. Los geles fueron manchados con azul brillante Coomassie o las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Protran) usando un sistema de transferencia de humedad (Biorad) en 25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 20 % de metanol. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora en PBS que contiene 0,1 % de Tween 20 y 0,5 % de Protifar (Nutricia). Los manchados fueron incubados con anticuerpos en tampón de bloqueo. Se detectó el enlace de anticuerpo usando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa IgG anti-conejo de cabra (Biosource) y detección de quimioluminiscencia mejorada (Pierce).

#### Inmunizaciones

Se cultivaron células BL21(DE3) que contienen pET11a-*tdff* en LB a una DO A<sub>600</sub> de 0,6 después de lo cual se agregó 1 mM de IPTG y se continuó con el crecimiento durante 2 horas. La proteína Tdfl se acumuló en cuerpos de inclusión, los cuales fueron aislados tal como se describe (40), y se usó la proteína purificada para inmunizar conejos en Eurogentec. El suero resultante, SN1042, se usó en una dilución 1/5000.

Las vesículas de membrana externa de la cepa CE1523/pEN11-*tdff* desarrolladas en presencia o ausencia de 1 mM de IPTG, fueron preparadas mediante extracción de desoxicolato (41) y usadas para inmunizar ratones tal como se describe (32). Los sueros de 10 ratones por grupo fueron recolectados después de 42 días y reunidos. Los experimentos cumplieron con las directrices nacionales de Bélgica relevantes y con las políticas Institucionales de Glaxo SmithKline Biologicals.

**RT-qPCR.**

Se llevó a cabo RT-qPCR usando un Sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR y mezcla maestra verde SYBR (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se aisló el ARN total resuspendiendo aproximadamente  $4 \times 10^9$  células *Neisseria* en 3 ml de Trizol (Invitrogen). Después de la adición de 600  $\mu$ l de cloroformo y de centrifugación, se mezcló la fase superior 1:1 con etanol al 75 %. Esto se cargó en una columna de ARN II nucleospin (Macherey-Nagel), que posteriormente se lavó con tampón R3 del equipo de ARN II nucleospin y eluida con 100  $\mu$ l de agua. Posteriormente el ARN fue tratado con Turbo DNA Free (Ambion) para producir ARN libre de ADN. Para generar el ADNc, se transcribió en forma inversa 1  $\mu$ g de ARN total procedente de hexámeros aleatorios usando el equipo de síntesis de ADNc de alta fidelidad de transcriptor (Roche) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Como un control, se prepararon muestras paralelas en las cuales la transcriptasa inversa fue omitida de la mezcla de reacción. Las PCR fueron llevadas a cabo por triplicado en un volumen de 25  $\mu$ l en una placa de 96 pocillos (Applied Biosystems) con los siguientes parámetros de ciclo: 95 °C durante 10 minutos para la activación de enzima seguido de 40 ciclos a una temperatura de 95 °C durante 15 segundos y a una temperatura de 60 °C durante 1 minuto. Se llevó a cabo un trazo de fusión para asegurar que la señal se originara del amplicón específico. El análisis de datos se llevó a cabo usando un procedimiento de valor de umbral de ciclo de comparación (Applied Biosystems) para determinar los niveles de expresión relativos. Se usó la transcripción *mpM* para normalizar todos los datos.

**ICP-MS.**

Se midieron concentraciones de zinc totales mediante ICP-MS en el laboratorio integrado del departamento de Geoquímica de la Universidad de Utrecht. Se cultivaron cepas de *N. meningitidis* en un medio RPMI de una DO  $A_{550}$  de inicio 0,1 durante 6 horas; en este punto de tiempo se tomó una muestra y el cultivo restante fue cultivado durante 1 hora adicional en la presencia de 1  $\mu$ M de zinc. Después de esta hora, se tomó una segunda muestra. Se lavaron ambas muestras (7 ml) en solución salina tamponada con fosfato y se resuspendieron en agua, se exterminaron mediante 1 hora a una temperatura de 56 °C y se descongelaron a una temperatura de -80 °C. Posteriormente las muestras fueron descongeladas, sonicadas y filtradas a través de filtros de 0,22  $\mu$ m (Millipore).

**Ensayo de competición PAR**

El ensayo de competición PAR es una reacción colorimétrica en donde el color naranja del complejo de PAR-zinc, cambia a amarillo en la presencia de una proteína o compuesto químico que tiene la capacidad de liberar el zinc de PAR. El ensayo se llevó a cabo tal como se describe (42) con las siguientes modificaciones: En lugar de 50  $\mu$ M se agregaron 30  $\mu$ M de zinc y se midió primero la solución de PAR-zinc y posteriormente se agregaron las vesículas de membrana externa a la cubeta y se volvió a medir la solución. En esta forma se evitó el cambio de color potencial inducido en tiempo mediante UV. Posteriormente los datos fueron primero normalizados a la medida de PAR-zinc y posteriormente a la muestra de PAR solo para obtener valores de enlace de las vesículas de membrana externa. Los resultados mostrados son los datos normalizados de la absorción en 500 nm.

**Ensayo bactericida de suero.**

Se transformó H44/76 tipo silvestre con pEN11-*tdff* y se inoculó de las placas desarrolladas durante la noche en TSB con 125  $\mu$ M de  $FeCl_3$  con o sin 1 mM de IPTG en frascos de agitación durante 3 horas a una temperatura de 37 °C hasta que se alcanzó una DO  $A_{550}$  de 0,5. El suero para ensayar se diluyó 1:100 en una solución de sal equilibrada de Hank (HBSS) (GIBCO), 0,3 % de BSA y posteriormente se diluyó en serie (pasos de dilución al doble, ocho diluciones) en un volumen de 50  $\mu$ l en placas de microtitulación de 96 pocillos estériles de fondo redondo (NUNC). Las bacterias se diluyeron en HBSS, 0,3 % de BSA para producir ~13.000 UFC por ml y se agregaron a las diluciones del suero muestras de 37,5  $\mu$ l de la suspensión. Se incubaron las placas de microtitulación a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos mientras se agitó. En forma subsecuente, se agregaron a los pocillos 12,5  $\mu$ l de complemento de cría de conejo (Pelfreez) o, como control para toxicidad de los sueros, complemento desactivado por calor (56 °C durante 45 minutos). Después de 1 hora de incubación a una temperatura de 37 °C mientras se agitó, las placas de microtitulación fueron colocadas en hielo para detener el exterminio. Para cada depósito, se aplicaron puntualmente 20  $\mu$ l sobre placas GC, mientras que las placas se inclinaron para permitir que la gota "corriera" hacia abajo en la placa. Después de la incubación durante la noche, se contaron las colonias y se calculó el porcentaje de exterminio. El título bactericida fue definido como la mayor dilución en suero con rendimiento de >50 % de exterminio.

**REFERENCIAS**

1. Ratledge, C. 2007. Metabolismo de hierro e infección (Iron metabolism and infection). Food. Nutr. Bull. 28:S515-523.
2. Wandersman, C, y P. Delepelaire. 2004. Fuentes de hierro bacterianas: procedentes de sideroforos a hemoforos (Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores). Annu. Rev. Microbiol. 58: 611-647.
3. Wiener, M. C. 2005. Transporte de membrana externa dependiente de TonB: ¿va para Baroque? (TonB-

- dependent outer membrane transport: going for Baroque?). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:394-400.
4. Postle, K. 1993. Proteína TonB y transducción de energía entre membranas (TonB protein and energy transduction between membranes). *J. Bioenerg. Biomembr.* 25:591-601.
5. Braun, V. 2006. Transferencia de energía entre membranas biológicas (Energy transfer between biological membranes). *ACS Chem. Biol.* 1:352-354.
6. De, S. K., M.T. McMaster, y G.K. Andrews. 1990. Inducción de endotoxina de expresión de gen de metalotioneína de murino (Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression). *J. Biol. Chem.* 265:15267-15274.
10. Corbin, B.D., E.H. Seeley, A. Raab, J. Feldmann, M.R. Miller, V.J. Torres, K.L. Anderson, B.M. Dattilo, P.M. Dunman, R. Gerads, R.M. Caprioli, W. Nacken, W.J. Chazin, y E.P. Skaar. 2008. Quelación de metal e inhibición del crecimiento bacteriano en abscesos de tejido (Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses). *Science.* 319:962-965.
8. Stephens, D. S., y S. M. Zimmer. 2002. Patogénesis, terapia y prevención de sepsis meningocócica (Pathogenesis, therapy, and prevention of meningococcal sepsis). *Curr. Infect. Dis. Rep.* 4:377-386.
15. Finne, J., M. Leinonen, y P. H. Mäkelä. 1983. Similitudes antigénicas entre componentes de cerebro y bacterias que originan meningitis. Implicaciones para el desarrollo de vacunas y patogénesis (Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis). *Lancet.* 2:355-357.
10. Pettersson, A., A. Maas, y J. Tommassen. 1994. Identificación del producto del gen *iroA* de *Neisseria meningitidis* como un receptor de lactoferrina (Identification of the *iroA* gene product of *Neisseria meningitidis* as a lactoferrin receptor). *J. Bacteriol.* 176:1764-1766.
11. Legrain, M., V. Mazarin, S.W. Irwin, B. Bouchon, M.J. Quentin-Millet, E. Jacobs, y A.B. Schryvers. 1993. Clonación y caracterización de genes de *Neisseria meningitidis* que codifican las proteínas de enlace-transferrina Tbp1 y Tbp2. (Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2). *Gene.* 130:73-80.
25. Lewis, L.A., E. Gray, Y.P. Wang, B.A. Roe, y D.W. Dyer. 1997. Caracterización molecular de *hpuAB*, el operón de uso de hemoglobina-haptoglobina de *Neisseria meningitidis* (Molecular characterization *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin-usage operon of *Neisseria meningitidis*). *Mol. Microbiol.* 23:737-749.
13. Stojiljkovic, I., V. Hwa, L. de Saint Martin, P. O'Gaora, X. Nassif, F. Heffron, y M. So. 1995. El receptor de hemoglobina de *Neisseria meningitidis*: su desempeño en uso de hierro y virulencia (The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron usage and virulence). *Mol. Microbiol.* 15:531-541.
30. Carson, S.D., P.E. Klebba, S.M. Newton, y P.F. Sparling. 1999. Enlace de enterobactina férrica y uso mediante *Neisseria gonorrhoeae* (Ferric enterobactin binding and usage by *Neisseria gonorrhoeae*). *J. Bacteriol.* 181: 2895-2901.
35. Turner, P.C., CE. Thomas, I. Stojiljkovic, C. Elkins, G. Kizel, D.A. Ala'Aldeen, y P.F. Sparling. 2001. Proteínas de membrana externa dependientes de TonB de *Neisseria*: detección, regulación y distribución de tres candidatos putativos identificados de las secuencias de genoma (*Neisseria* TonB-dependent outer-membrane proteins: detection, regulation and distribution of three putative candidates identified from the genome sequences). *Microbiology.* 147:1277-1290.
40. Ducey, T.F., M.B. Carson, J. Orvis, A.P. Stintzi, y D.W. Dyer. 2005. Identificación de genes que responden a hierro de *Neisseria gonorrhoeae* mediante análisis de micromatrices en un medio definido (Identification of the iron-responsive genes of *Neisseria gonorrhoeae* by microarray analysis in defined medium). *J. Bacteriol.* 187:4865-4874.
17. Grifantini, R., E. Frigimelica, I. Delany, E. Bartolini, S. Giovinnazzi, S. Balloni, S. Agarwal, G. Galli, C. Genco, y G. Grandi. 2004. Caracterización de un *Fur* de *Neisseria meningitidis* novedoso y operón regulado por hierro requerido para protección contra estrés oxidativo: utilidad de micromatriz de ADN en la asignación del desempeño biológico de genes hipotéticos (Characterization of a novel *Neisseria meningitidis* *Fur* and iron-regulated operon required for protection from oxidative stress: utility of DNA microarray in the assignment of the biological role of hypothetical genes). *Mol. Microbiol.* 54:962-979.
50. Dove, J. E., K. Yasukawa, CR. Tinsley, y X. Nassif. 2003. Producción de la molécula de señalización, autoinductor-2, mediante *Neisseria meningitidis*: carencia de pruebas de una respuesta de transcripción concertada (Production of the signalling molecule, autoinducer-2, by *Neisseria meningitidis*: lack of evidence for a concerted transcriptional response). *Microbiology.* 149: 1859-1869.
19. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, y D.J. Lipman. 1997. BLAST con huecos y PSI-BLAST: una nueva generación de programas de búsqueda de base de datos de proteína (Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs). *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
55. Furano, K., y A.A. Campagnari. 2004. Identificación de una proteína de uso de hemo de *Moraxella catarrhalis* (HumA) (Identification of a heme usage protein of *Moraxella catarrhalis* (HumA)). *Infect. Immun.* 72:6426-6432.
21. Mazoy, R., y M.L. Lemos. 1996. Identificación de proteínas de enlace-hemo en las membranas celulares de *Vibrio anguillarum* (Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of *Vibrio anguillarum*). *FEMS Microbiol. Lett.* 135:265-270.
60. Ghigo, J.M., S. Létoffé, y C. Wandersman. 1997. Nuevo tipo de sistema de adquisición hemo dependiente de

- hemoforo de *Serratia marcescens* reconstituido en *Escherichia coli* (A new type of hemophore-dependent hemo acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*). *J. Bacteriol.* 179:3572-3579.
23. Patzer, S.I., y K. Hantke. 1998. Sistema de captación de zinc de alta afinidad ZnuABC y su Zur regulador en *Escherichia coli* (The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*). *Mol. Microbiol.* 28: 1199-1210.
24. Ferguson, A.D., E. Hofmann, J.W. Coulton, K. Diederichs, y W. Welte. 1998. Transporte de hierro transmitido por sideroforo: estructura de cristal de FhuA con lipopolisacárido enlazado (Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide). *Science.* 282:2215-2220.
25. Yatsunyk, L.A., J.A. Easton, L.R. Kim, S.A. Sugarbaker, B. Bennett, R.M. Breece, Vorontsov, II, D.L. Tierney, M. W. Crowder, y A.C. Rosenzweig. 2008. Estructura y propiedades de enlace de metal de ZnuA, un transportador de zinc periplásmico de *Escherichia coli* (Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*). *J. Biol. Inorg. Chem.* 13:271-288.
26. Bentley, S.D., G.S. Vernikos, L.A. Snyder, C. Churcher, C. Arrowsmith, T. Chillingworth, A. Cronin, P.H. Davis, N.E. Holroyd, K. Jagels, M. Maddison, S. Moule, E. Rabinowitsch, S. Sharp, L. Unwin, S. Whitehead, M. A. Quail, M. Achtman, B. Barrell, N.J. Saunders, y J. Parkhill. 2007. Mecanismos de variación genética meningocócica vistos a través de análisis comparativo de la cepa FAM18 del serogrupo C (Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18). *PLoS Genet.* 3:e23.
27. Dempsey, J.A., W. Litaker, A. Madhure, T.L. Snodgrass, y J. G. Cannon. 1991. Mapa físico del cromosoma de *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 con ubicaciones de marcadores genéticos, incluyendo genes opa y pil (Physical map of the chromosome of *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 with locations of genetic markers, including opa and pil genes). *J. Bacteriol.* 173:5476-5486.
28. Parkhill, J., M. Achtman, K.D. James, S.D. Bentley, C. Churcher, S.R. Klee, G. Morelli, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R.M. Davies, P. Davis, K. Devlin, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, K. Mungall, M.A. Quail, M.A. Rajandream, K.M. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Spratt, y B. G. Barrell. 2000. Secuencia de ADN completa de una cepa del serogrupo A de *Neisseria meningitidis* Z2491 (Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491). *Nature.* 404:502-506.
29. Tettelin, H., N.J. Saunders, J. Heidelberg, A.C. Jeffries, KX. Nelson, J.A. Eisen, K.A. Ketchum, D.W. Hood, J.F. Peden, R.J. Dodson, W.C. Nelson, M.L. Gwinn, R. DeBoy, J.D. Peterson, E.K. Hickey, D.H. Haft, SX. Salzberg, O. White, R.D. Fleischmann, B.A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D.S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E.B. Clark, M.D. Cotton, T.R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Massignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, CM. Fraser, E.R. Moxon, R. Rappuoli, y J. C Venter. 2000. Secuencia de genoma completo de la cepa MC58 del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58). *Science.* 287:1809-1815.
30. Chen, CY., y S.A. Morse. 2001. Identificación y caracterización de un sistema de captación de zinc de alta afinidad en *Neisseria meningitidis*. (Identification and characterization of a high-affinity zinc uptake system in *Neisseria gonorrhoeae*). *FEMS Microbiol. Lett.* 202:67-71.
31. Ammendola, S., P. Pasquali, C Pistoia, P. Petrucci, P. Petrarca, G. Rotilio, y A. Battistoni. 2007. El sistema de captación de Zn<sup>2+</sup> de alta afinidad ZnuABC se requiere para la homeostasis de zinc bacteriana en ambientes intracelulares y contribuye a virulencia de *Salmonella enterica* (The high affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to virulence of *Salmonella enterica*). *Infect. Immun.* 75:5867-5876.
32. Stewart, A.J., CA. Blindauer, S. Berezhenko, D. Sleep, y P.J. Sadler. 2003. Sitio de zinc de interdominio en albúmina humana (Interdomain zinc site on human albumin). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:3701-3706.
33. Wu, H.J., K.L. Seib, Y.N. Srikhanta, S.P. Kidd, J.L. Edwards, T.L. Maguire, S.M. Grimmond, M.A. Apicella, A.G. McEwan, y M. P. Jennings. 2006. PerR controla la resistencia dependiente de Mn a la tensión oxidativa en *Neisseria gonorrhoeae* (PerR controls Mn-dependent resistance to oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*). *Mol. Microbiol.* 60:401-416.
34. Nanamiya, H., G. Akanuma, Y. Natori, R. Murayama, S. Kosono, T. Kudo, K. Kobayashi, N. Ogasawara, S.M. Park, K. Ochi, y F. Kawamura. 2004. El zinc es un factor clave en el control de la alternancia de dos tipos de proteína L31 en el ribosoma de *Bacillus subtilis* (Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome). *Mol. Microbiol.* 52:273-283.
35. Hagen, T.A., y C.N. Cornelissen. 2006. *Neisseria gonorrhoeae* requiere expresión de TonB y el transportador putativo TdfF para réplica dentro de células epiteliales cervicales (*Neisseria gonorrhoeae* requires expression of TonB and the putative transporter TdfF to replicate within cervical epithelial cells). *Mol. Microbiol.* 62:1144-1157.
36. Bos, M. P., B. Tefsen, P. Voet, V. Weynants, J.P.M. van Putten, y J. Tommassen. 2005. Función de la fosfolipasa A de membrana externa neisserial en autólisis y evaluación de su potencial como vacuna (Function of neisserial outer membrane phospholipase A in autolysis and assessment of its vaccine potential). *Infect. Immun.* 73:2222-2231.
37. Voulhoux, R., M.P. Bos, J. Geurtsen, M. Mols, y J. Tommassen. 2003. Función de una proteína bacteriana altamente conservada en un ensamblaje de proteína de membrana externa (Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly). *Science.* 299:262-265.

38. Datsenko, K.A., y B. L. Wanner. 2000. Desactivación de un paso de genes cromosómicos en *Escherichia coli* K-12 usando productos de PCR (One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:6640-6645.

39. Tommassen, J., P. Vermeij, M. Struyvé, R. Benz, y J. T. Poolman. 1990. Aislamiento de mutantes de *Neisseria meningitidis* con deficiencia de proteínas de membrana externa clase 1 (PorA) y clase 3 (PorB) (Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in class 1 (PorA) and class 3 (PorB) outer membrane proteins). Infect. Immun. 58:1355-1359.

40. Dekker, N., K. Merck, J. Tommassen, y H. M. Verheij. 1995. Plegamiento *in vitro* de fosfolipasa A de membrana externa de *Escherichia coli* (In vitro folding of *Escherichia coli* outer-membrane phospholipase A). Eur. J. Biochem. 232:214-219.

41. Weynants, V.E., CM. Feron, K.K. Goraj, M.P. Bos, P.A. Denoel, V.G. Verlant, J. Tommassen, I.R. Peak, R.C. Judd, M.P. Jennings, y J. T. Poolman. 2007. Actividad bactericida aditiva y sinérgica de anticuerpos dirigidos contra proteínas de membrana externa menor de *Neisseria meningitidis* (Additive and synergistic bactericidal activity of antibodies directed against minor outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*). Infect. Immun. 75:5434-5442.

42. Lim, K.H., C.E. Jones, R.N. vanden Hoven, J.L. Edwards, M.L. Falsetta, M.A. Apicella, M.P. Jennings, y A.G. McEwan. 2008. Especificidad de enlace de metal de la permeasa MntABC de *Neisseria meningitidis* y su influencia en el crecimiento bacteriano e interacción con células epiteliales cervicales (Metal binding specificity of the MntABC permease of *Neisseria gonorrhoeae* and its influence on bacterial growth and interaction with cervical epithelial cells). Infect. Immun. 76:3569-3576.

Tabla 1. Conservación de secuencia de proteína Tdf1 madura en las cepas de *Neisseria* secuenciadas

		(%) de Identidad						
Cepa		MC58	Fam18	Z2491	053442	FA1090	NCCP 11945	ST-640
% de similitud	<i>N. meningitidis</i> MC58		730/734 (99,5)	720/734 (98,1)	720/734 (98,1)	706/734 (96,2)	707/734 (96,3)	712/734 (97,0)
	<i>N. meningitidis</i> Fam18	733/734 (99,9)		722/734 (98,4)	718/734 (97,8)	705/734 (96,0)	706/734 (96,2)	712/734 (97,0)
	<i>N. meningitidis</i> Z2491	725/734 (98,8)	726/734 (98,9)		716/734 (97,5)	707/734 (96,3)	706/734 (96,2)	710/734 (96,7)
	<i>N. meningitidis</i> 053442	726/734 (98,9)	727/734 (99,0)	723/734 (98,5)		706/734 (96,2)	707/734 (96,3)	707/734 (96,3)
	<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090	715/734 (97,4)	714/734 (97,3)	714/734 (97,3)	715/734 (97,4)		733/734 (99,9)	702/734 (95,6)
	<i>N. gonorrhoeae</i> NCCP11945	716/734 (97,5)	715/734 (97,4)	713/734 (97,1)	716/734 (97,5)	733/734 (99,9)		701/734 (95,5)
	<i>N. lactamica</i> ST-640	717/734 (97,7)	718/734 (97,8)	718/734 (97,8)	715/734 (97,4)	711/734 (96,9)	710/734 (96,7)	

## REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende: vesículas de membrana externa aislada preparadas a partir de una especie de bacteria de *Neisseria*, en donde la especie de bacteria *Neisseria* produce un nivel de un polipéptido NMB0964, el cual en la cepa MC58 de *N. meningitidis* tiene la secuencia mostrada en la figura S1, suficiente para producir una vesícula la cual, cuando se administra a un sujeto, genera anticuerpos anti-NMB0964; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde
- 5
- (i) dicha especie de bacteria de *Neisseria* se modifica genéticamente a través de la interrupción de la expresión funcional del represor Zur (NMB1266); y/o
- (ii) dicha especie de bacteria de *Neisseria* se cultiva en un medio que tiene menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  libre; o
- 10 (iii) la especie de bacteria de *Neisseria* se cultiva en un medio que comprende un quelante de  $\text{Zn}^{2+}$ .
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el nivel del polipéptido NMB0964 producido a través de la especie de bacteria de *Neisseria* es:
- 15 mayor que el elaborado a través de la cepa H44/76 de *N. meningitidis* desarrollada en un caldo de soja tríplico (TSB), o;
- es igual o mayor que el elaborado por la cepa H44/76 de *N. meningitidis* desarrollada en un medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), o;
- es igual o mayor que el elaborado por la cepa H44/76 de *N. meningitidis* desarrollada en un medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) con 1  $\mu\text{M}$  de TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina), o;
- 20 es igual o mayor que el elaborado por la cepa H44/76 de *N. meningitidis* en un medio el cual tiene menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  libre.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o 2, en la que la especie de bacteria de *Neisseria* es *Neisseria meningitidis* o *Neisseria meningitidis* serogrupo B.
4. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-3, en la que la especie de bacteria de *Neisseria* tiene deficiencia del polisacárido capsular, preferentemente en la que la especie de bacteria de *Neisseria* tiene deficiencia del polisacárido capsular a través de la interrupción de la expresión funcional del gen *siaD*.
- 25
5. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-4, caracterizada porque la especie de bacteria de *Neisseria* es interrumpida en:
- 30 la expresión funcional de los genes *msbB* y/o *htrB*; y/o
- la expresión de uno o más de los siguientes genes: *PorA*, *PorB*, *OpA*, *OpC*, *PilC* o *FrpB*; y/o la expresión funcional del gen *IgtB*.
6. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-5, en la que la especie de bacteria de *Neisseria* es del inmunotipo L2 o L3.
7. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-6, en la que las vesículas de membrana externa son aisladas extrayendo con el 0-0,5, 0,02-0,4, 0,04-0,3, 0,06-0,2 o 0,08-0,15 % de detergente, por ejemplo desoxicolato, por ejemplo con aproximada o exactamente el 0,1 % de desoxicolato.
- 35
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el quelante de  $\text{Zn}^{2+}$  está presente en el medio en una concentración de 0,01-100, 0,1-10, 0,3-5 o 0,5-1  $\mu\text{M}$ .
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 u 8, en la que el quelante de  $\text{Zn}^{2+}$  presente en el medio es TPEN.
- 40
10. Un procedimiento para producir una composición inmunogénica, comprendiendo el procedimiento:
- 45 cultivar una especie de bacteria de *Neisseria* que produce un polipéptido NMB0964, el cual en la cepa MC58 de *N. meningitidis* tiene la secuencia mostrada en la figura S1, en donde el polipéptido NMB0964 es producido a un nivel suficiente para producir vesículas de membrana externa que, cuando se administran a un sujeto, generan anticuerpos anti-NMB0964; preparar vesículas de membrana externa a partir de la bacteria cultivada; y combinar las vesículas de la membrana externa con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición inmunogénica adecuada para administración a un sujeto, en donde
- (i) dicha especie de bacteria de *Neisseria* ha sido modificada genéticamente a través de la interrupción de la expresión funcional del represor Zur (NMB1266); y/o

- (ii) dicho cultivo de la especie de bacteria de *Neisseria* está en un medio que tiene menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  libre; o
- (iii) dicho cultivo de la especie de bacteria de *Neisseria* está en un medio que comprende un quelante de  $\text{Zn}^{2+}$ .

5 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que:

el nivel de polipéptido NMB0964 producido por la especie de bacteria de *Neisseria* es como se ha definido en la reivindicación 2;

10 la especie de bacteria de *Neisseria* es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3-6; y/o la etapa de preparar vesículas de membrana externa se lleva a cabo como se ha definido en la reivindicación 7, o se lleva a cabo sin el uso de un detergente.

12. El procedimiento de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que el quelante de  $\text{Zn}^{2+}$  está presente en el medio en una concentración de 0,01-100, 0,1-10, 0,3-5 o 0,5-1  $\mu\text{M}$ .

13. El procedimiento de las reivindicaciones 10-12, en el que el quelante de  $\text{Zn}^{2+}$  presente en el medio es TPEN.

14. Una composición inmunogénica que se puede obtener por medio del procedimiento de la reivindicación 10.

15 15. Un uso de la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-9 en la fabricación de una vacuna para la prevención de una enfermedad causada por *Neisseria*; o una vacuna para su uso en la prevención de una enfermedad causada por *Neisseria*, por ejemplo, *N. meningitidis* o *N. meningitidis* serogrupo B, que comprende la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-9, o elaborada por medio del procedimiento de las reivindicaciones 10.13.

20

Fig. 1

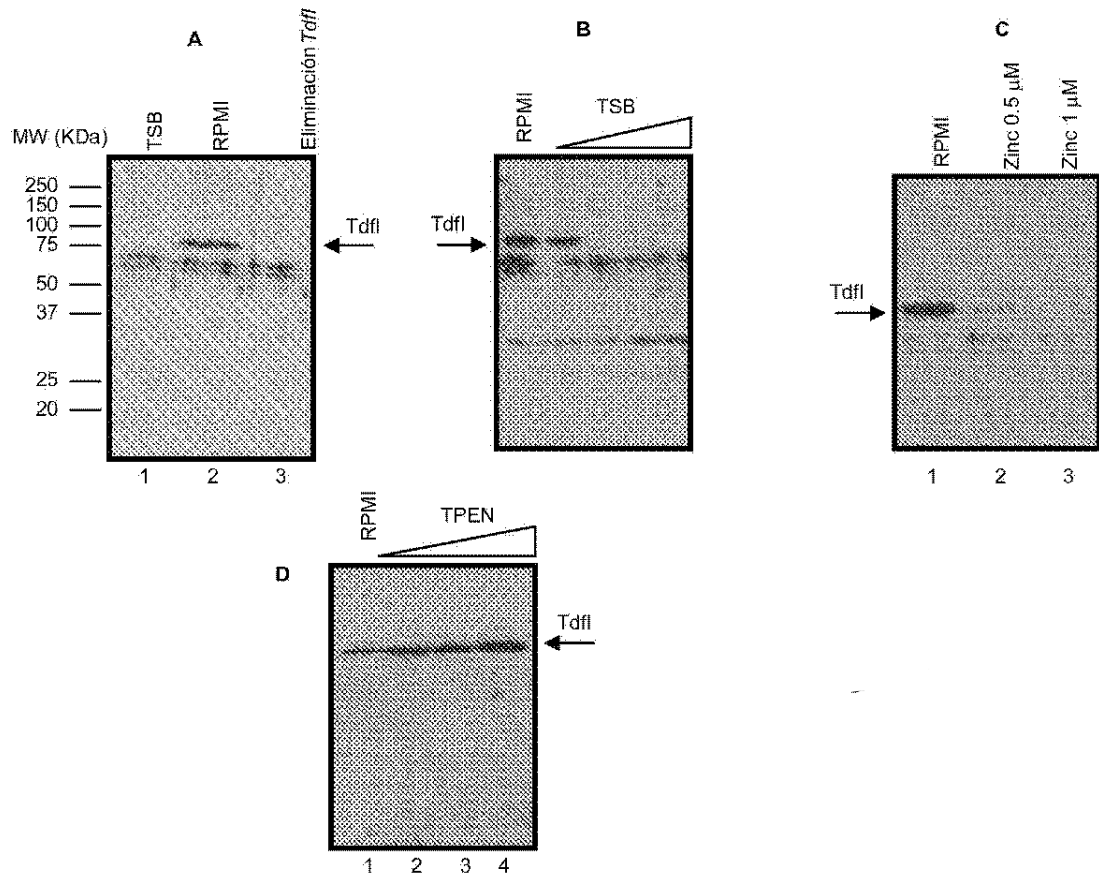




Fig. 2

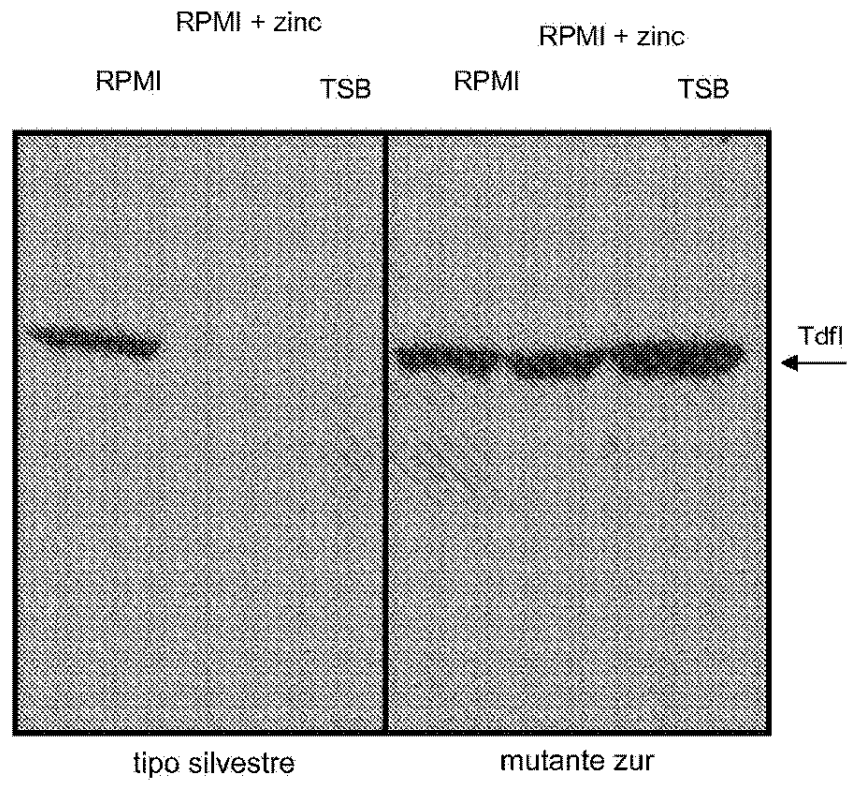


Fig. 3

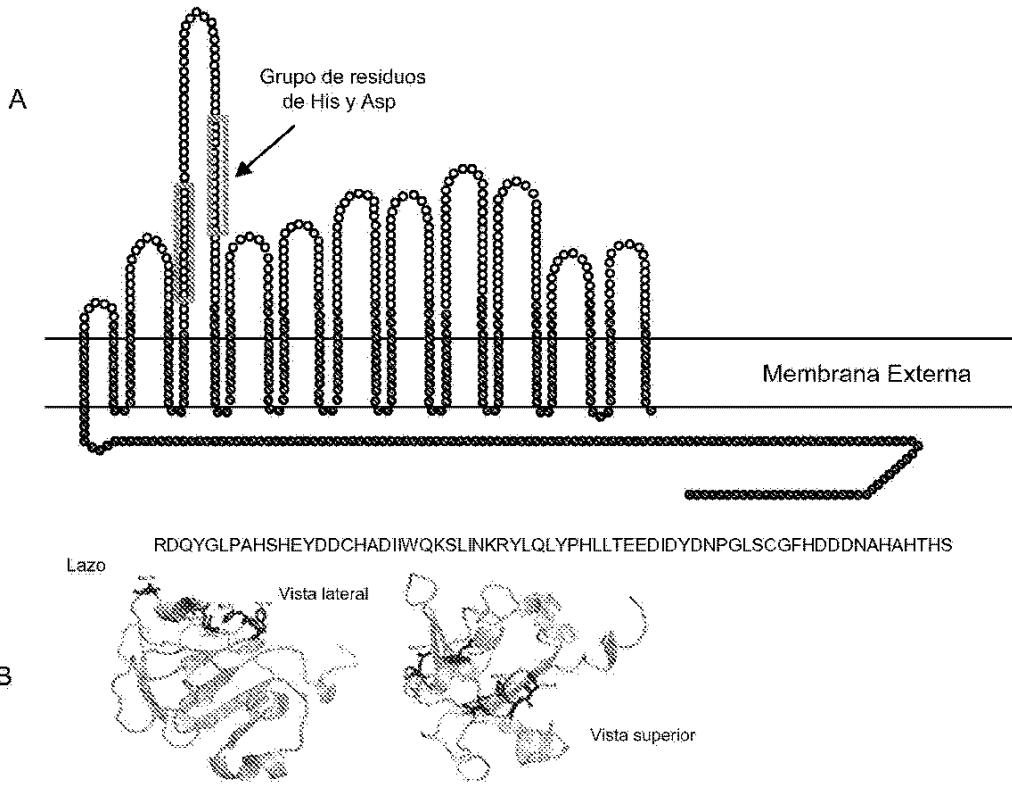


Fig. 4

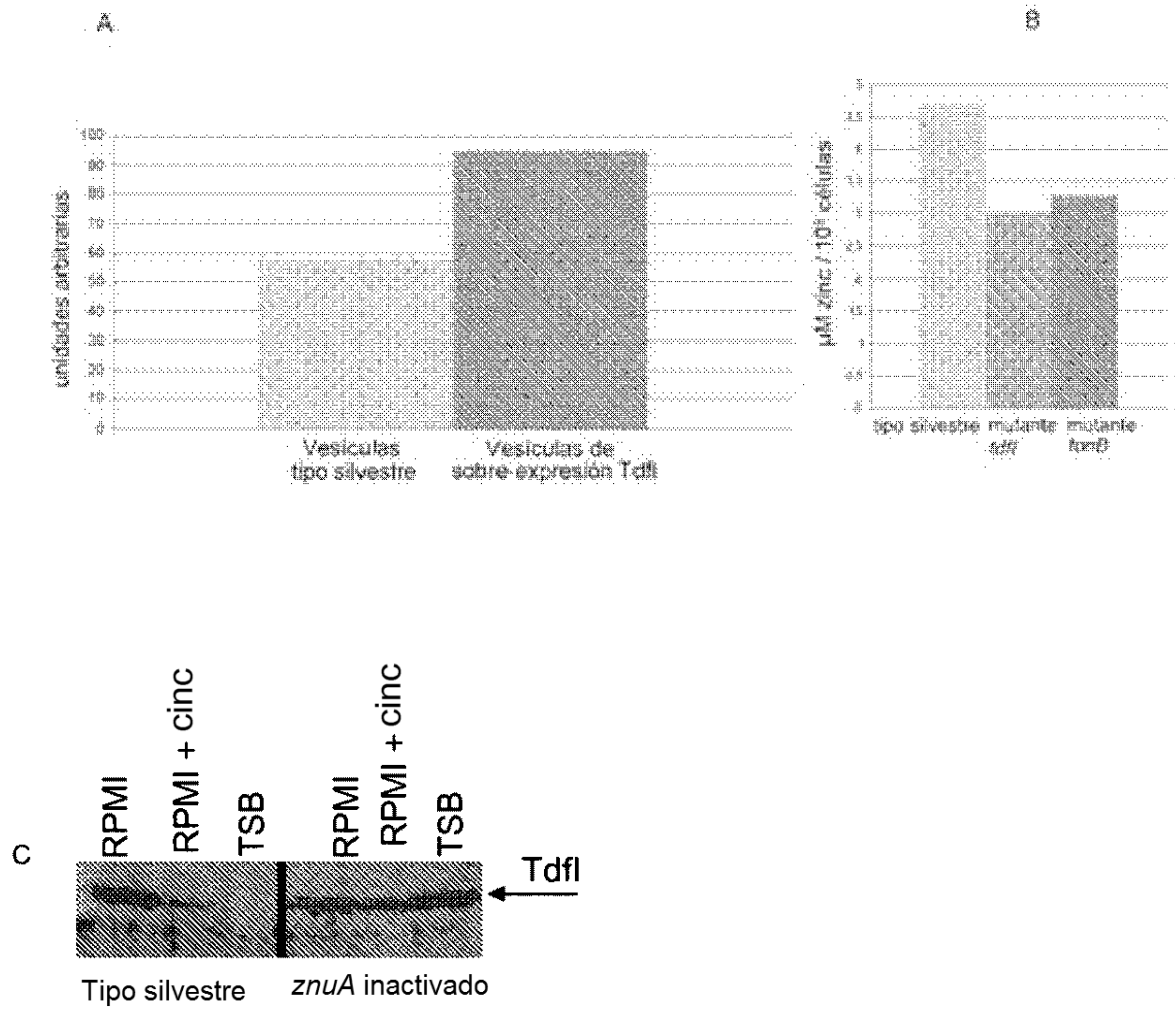


Fig. 5

**Expresión de Tdfl en 32 diferentes cepas de *Neisseria meningitidis***

Cepa	Serogrupo	Linaje clonal <sup>a</sup>	Zinc		Cepa	Serogrupo	Linaje clonal <sup>a</sup>	Zinc	
			-	+				-	+
Z2491	A	IV			MC51	C			
FAM 18	C	ET-37			MC50	C			
MC58	B	ET-5			126E	C	-		
B40	A	I			2208	A			
Z6835	A	VI			BNCV	B	ET-37		
Z3524	A	III			6940	B	-		
Z6466	A				M981	B	ET-2		
ROU	W135	ET-37			M992	B	-		
BZ10	B	Grupo A4			881710	B			
BZ198	B	Linaje 3			881607	B			
NG-G40	B	ET-57			2996	B	ST-8		
NG4/88	B	ET-67			S3446	B	ET-8		
BZ147	B	ET-164			13077	A	IV		
297-0	B	ET-69			B16B6	B	ET-37		
M990	B	-			H44/76	B	ET-5		
35E	C	-			8013	C	ST-18		

Fig. 6

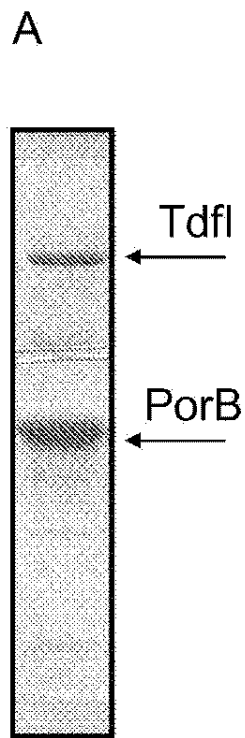


Figura 7

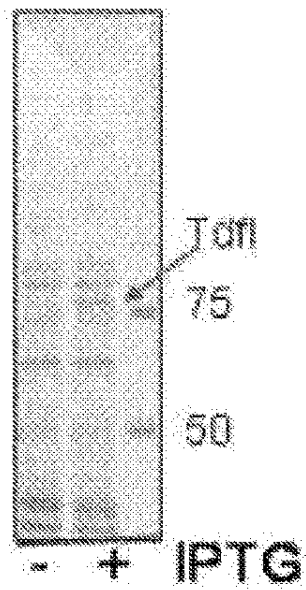


FIG. S1 (Figura Suplementaria 1)

```

< Secuencia de señal > <Tb > < dominio de conexión
MC58 1 MAQTTLKPIVLSILLINTPLLAQAHETEQSVLETVSVVGKSRPRATSGLLHTSTASDKI 60
O53322 .....G.....T.....
Z2491 .....S...G....G.....
FAM18 .....
α14 .....
α153 .....DR.....
α275 .....

dominio de conexión
MC58 61 ISGDTLRQKAVNLGDALDGVPGIHASQYGGGASAPVIRGQTGRRIKVLNHHGETGDMADF 120
O53422 .....
Z2491 .....
FAM18 L.....
α14 .....
α153 .....
α275 .....

dominio de conexión >> Tm1 >
MC58 121 SPDHAIMVDTALSQQVEILRGPVTLLYSSGNVAGLVVDVADGKIPEKMPENGVSGELGLRL 180
O53422 .....
Z2491 .....S.....
FAM18 .....
α14 .....
α153 .....
α275 .....S.....

< lazo 1>> Tm2 > < Tm3 >< lazo 2 >< Tm4
MC58 181 SSGNLEKLTSGGINIGLGNFVLHTEGLYRKSGDYAVPRYRNLRKLPDSHADSQTGSIGL 240
O53422 .....K.....
Z2491 .....
FAM18 .....
α14 .....
α153 .....
α275 .....

> < Tm5 >< lazo 3
MC58 241 SWVGEKGFIVAYSDDRDQYGLPAHSHEYDDCHADIIWQKSLINKRYLQLYPHLLTEEDI 300
O53422 .....A.....V
Z2491 .....A.....
FAM18 .....
α14 .....V
α153 .....A.....
α275 .....A.....

>> Tm6 > < Tm7 >
MC58 301 DYDNPGLSCGFHDDDDNAHAHTHSGRPWIDLNRNKRYELRAEWKQFPFGFEALRVHLNRNDY 360
O53422 .....N.K.....L.....
Z2491 .....D...A.N.K.....
FAM18 .....D.....
α14 .....D...A.N.K.....
α153 .....D...A.N.K.....
α275 .....D...A.N.K.....

```

# ES 2 424 233 T3

```

< lazo 4 >< Tm8 > < Tm9 >< lazo 5
MC58 361 RHDEKAGDAVENFFNNQTQNARIELRHQPIGRLEKGSWGVQYLQOKSSALSASEAVKQPM 420
O53422 H.....K.....
Z2491 .....G.....T.....
FAM18 .....
α14 .....T.....
α153 .....T.....
α275 H.....G.....T.....

>< Tm10 > < Tm11 >< lazo 6
MC58 421 LLDNKVQHYSFFGVEQANWDNFTLEGGVRVEKQKASIQYDKALIDRENYNHPLPDLGAH 480
O53422 .....E.....KQ.....
Z2491 .....R.....
FAM18 .....R.....
α14 .....R.....
α153 .....R.....
α275 .....R.....

>< Tm12 > < Tm13 >< lazo 7 >
MC58 481 RQTARSFALSGNWFYTPQHKLSLTASHQERLPSTQELYAHGKHVATNTFEVGNKHLNKER 540
O53422 .....
Z2491 .....
FAM18 .....
α14 .....
α153 .....
α275 .....

< Tm14 > < Tm15 >< lazo 8
MC58 541 SNNIELALGYEGDRWQYNLALYRNRFNGYIYAQTLNDGRGPKSIEDDSEMKLVRYNQSGA 600
O53422 .....
Z2491 .....
FAM18 .....
α14 .....
α153 .....
α275 .....

>< Tm16 > < Tm17 >< lazo 9
MC58 601 DFYGAEGEIFYFKPTPRYRIGVSGDYVRGRLKNLPSLPGREDAYGNRPFIAQDDQNAPRVP 660
O53422 .....L..A.....
Z2491 .....
FAM18 .....
α14 .....
α153 .....
α275 .....

>< Tm18 > < Tm19 >< lazo 10 >< Tm20 > <
MC58 661 AARLGFHLKASLTDRIDANLDYYRVFAQNKLARYETRTPGHHMLNLGANYRRNTRYGEWN 720
O53422 .....V.....
Z2491 .....V.....
FAM18 .....V.....
α14 .....V.....
α153 .....V.....
α275 .....V.....

Tm21 >< lazo 11 >< Tm22 >
MC58 721 WYVKADNLLNQSVYAHSSFLSDTPQMGRSFTGGVNVKF 758
O53422 .....
Z2491 .....
FAM18 .....
α14 .....
α153 .....
α275 .....

```

FIG. S2 (Figura Suplementaria 2)

FORMATO CLUSTAL de T-COFFEE Version\_6.07 [http://www.tcoffee.org]

```

A. baumannii      MLNKS-----LFLAL-ITLGASK-ILL--AA---EGPVTTLNTI
A. pleuropneumoniae MFNKKL-----LAVL-ISAQFSP-LVW--AN---NNDVAVLDEV
H. parasuis      MINNRTTE-----QNNRRTA-FSLAFSL-LCCCLGI---NAEQLELDEI
B. pertussis     MICYIVSFNENGTSFYREGNMRFERHPLSAAL-ALALAWQGAHAQASADGTSEAAATLAPI
M. catarrhalis   MKVTMI-----KKPLACAI-LATFSM-PMLAEANLKD-KPTVILDGV
M. haemolytica   ML-----KKNYLTVSI-LLAISG-VGYA-----NEISLETI
P. multocida     MPLLTLLKINM---F---F-MRKISYLSLCVISALYSQ-LAVAQSPLKNTSEHIELEPI
N. meningitidis  MAQTTL-----KPIVLST-LLINT--PLLAQAEH--TEQSVLDLETV
*                   :                   *

A. baumannii      VLTAQSDDELGSELLGKSLNVSNQFIDTSK-LKQRSTTLGDALGTELGIHSNQYGGGASAP
A. pleuropneumoniae SVVGSTPISQGEVTLTKVSDKIACKE-FKKRSATLGNALAAELGVHNSPFFGGGASKP
H. parasuis      SVMGKVPPE---GNSISFLKVSDAIIDGK-FKNRSATLGNALSSELGVHSTPFFGGGASAP
B. pertussis     TVSA--SPL-AG-DLDSMTAPAAVLEGDQLLLRRQGTLDGTLGGLPGVHADTFGGGASRP
M. catarrhalis   SITSLADQNTPEFGVNHKTVSGITVSKEQ-LQQRATTLGDALAGELGVHNSHFFGGGASAP
M. haemolytica   TVDQNTPTKTKLLGGELNSNEVVDKLN-LKQGSITLGNALSSELGTHSSQFFGGGASAP
P. multocida     FVNTLIESREGAPLGGRLMASEKIIIPAYS-LKQGSNLGDALSSELGTHASQFFGGGASAP
N. meningitidis  SVVCKSRPRATSGLLHTSTASDKIISGDT-LRQKAVNLGDALDGVPGIHASQYGGGASAP
:                   :                   : . . . . . : * : * : * : * : * : * : *

A. baumannii      IIRGQEGKRIKVLQNNADVLDMSNMSPDHAVTVEPSPAKSIEIIRGASTLLYSSNSAAGV
A. pleuropneumoniae IIRGQEGARIRILQNGSDVIDMSNLSPDHAVVADSLAKQVEILRGSSTLLYASSSPAGI
H. parasuis      IIRGQEGVRVKILQNNADVVDMSNISPDHAIADTLLANQVEILRGAETLLYASSSPAGI
B. pertussis     VIRGQTAPRVKVLSDGSELMDASAIISPDHAVTTEPLLADKIEVLRGPATLLYGGGAIQGV
M. catarrhalis   IIRGQEGKRLKILQNGSEVVDMSGLSPDHAIADTLLAKQVEILRGSSTLLYASSNSAGV
M. haemolytica   IIRGQESKRAKILQNGENLDMSGMSPDHAVTVDALLAKRIEILRGPATLLYAGNTAGV
P. multocida     VIRGQEGKRIKVLSSGNETLDMSSAMS PDHAVVADSLAKKVEILRGANTLLYSSGNAAGV
N. meningitidis  VIRGQTRRRIKVLNHHGETGDMADFSPDHAIMVDTALSQQVEILRGPVTTLLYSSGNVAGL
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

A. baumannii      VNVVDKRIPTPEIPEKGYEVELNSRFDTAKEKVGALGATFGIGKHIAVRAEGLTRHSNRY
A. pleuropneumoniae VNVVDKRIPTPEIPEKGYEVELNSRFDTAKEKVGALGATFGIGKHIAVRAEGLTRHSNRY
H. parasuis      VNVVDKRIPTPEIPEKGYEVELNSRFDTAKEKVGALGATFGIGKHIAVRAEGLTRHSNRY
B. pertussis     VNVVDKRIPTAVPQQGIEAAELRGATGTERAGAIIGITAGSG-NFAVRVEGLKRRSSDY
M. catarrhalis   VNVVDKRIPTKLPK-LQGDVTVRLSSANREKLITASAEAPLGEHVAVRVAGLSKQAADY
M. haemolytica   VNVVDKRIPTAIPEKGYEGQFVRFSGASKEKRLTYAGSTFALGNHLALRVQGMYNKASEY
P. multocida     VNVVDKRIPTAE-VVGVEGVEGLRTGSADNEKLVNVALDVLGSLKHFALHLEGLHKKAGDY
N. meningitidis  VDVADGKIPEKMPENGVSSELGLRLSSGNLEKLTSGGINIGLGNFVLTHTGLYKRSQDY
: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

A. baumannii      KTPHYQSSSYNSLEDLEN---QNVYKNLKYLPEWAE SRLTGLGLSWIDDNTYLGVSYT
A. pleuropneumoniae RVPGINL-----GERLNYVPDPTYNKSKVGTGLGSLFVSGQGYIGASYS
H. parasuis      KVPQIKL-----GETLNYVPDPTYHQSKVGTIGLSFVSGQGYIGASYS
B. pertussis     RVPDWD-----GKLAGSYSESGQGTVMGSWITPRGYVGVAFPT
M. catarrhalis   KTPRFDRHVFENKHEDDNTQPEFIYKDTLKLHPDSSHAKSNAGTLGVSWSVGNQGLGASVS
M. haemolytica   YAPIHTI-----EGKPYHVRPDSVQSGTGTVLSVGLGERGHLGIAYT
P. multocida     RTPSYQY-----QGSTHKKLANSFVDRSGSVGLSWVGDGKGYLGVAYS
N. meningitidis  AVPRYR-----NLKRLPDSHADSQTGSIGLSWVGEKGFVGVAYS
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

A. baumannii      HRHDEYGLPAHLYEYEAHAIINTRISGLKNYLLYPQLMEEQDINVYVNRPDCH--
A. pleuropneumoniae KRRDNYGLPCHNKTGTELEIYGN---KQGYAYTYLPHLIGEENIG-SNPHFHCGT
H. parasuis      QRKDRYGLPCHNKTGTELEIYGN---KQGYAYTYLPHLIGEENIG-SNPHFHCGT
B. pertussis     HLESKYGLPCHNKTGTELEIYGN---KQGYAYTYLPHLIGEENIG-SNPHFHCGT
M. catarrhalis   LRRDKYGLPCHNKTGTELEIYGN---KQGYAYTYLPHLIGEENIG-SNPHFHCGT
M. haemolytica   DRRDKYGLPCHNKTGTELEIYGN---KQGYAYTYLPHLIGEENIG-SNPHFHCGT
P. multocida     QRKDKYGLPCHNKTGTELEIYGN---KQGYAYTYLPHLIGEENIG-SNPHFHCGT
N. meningitidis  DRRDQYGLPCHNKTGTELEIYGN---KQGYAYTYLPHLIGEENIG-SNPHFHCGT
...*** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

A. baumannii      -----QH-----NHTHT-FFN-----NAPYIDLNTRRYDMRGFTQPFTGIDK
A. pleuropneumoniae -----EAEID-TECHDN---FCHDE-DHTN---PGPWVDLESKRFDVKAELRQPPFKGIDK
H. parasuis      -----YDLPSHSDN---YCHDE-DHTN---IGPWVDLHLSKRIDIKGEIKQPLPMLDK
B. pertussis     DDHG-----HGHDEHEDEAEHDE-CHENAGDVPYVKLRNSRNTDLRAEYDPPFAGFEK
M. catarrhalis   DDDE-----HEHDAI--DHEHDE-CHEN---GKFWIDLKMKRYDVQGGINAPFAGIDK
M. haemolytica   -----HTIYCSH-----YCHDE-DHTN---GKFWIDMHSKRYDIDGSLQNPPLPFEE
P. multocida     EWGSHCHLCHGHCHHHC---NCHSHHHAH---ADPHALNTQRWDLRGEWKNPVKGLDK
N. meningitidis  -----E-----D-----NANA---EHTN---GREWIDLNRKRYELRAEWKQPPPFEEA
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
    
```



ES 2 424 233 T3

```

A. baumannii      IRTSLSYIDYFHNELEGDKI-----TNFFKNTGKVGRIELSHQ----
A. pleuropneumoniae IKVSYADADYYHDEKDAAGVLA TRYH-KQLKKDQDYGKPVNI FKNRGNARLEIYHA----
H. parasuis       IQLSYAQTDDYHDEKDAKSGDITINPNRVKSKDFGKPVNI FKNQGNARLEFFHT----
B. pertussis      IRFRGGLTDYRHDEIEGGQL-----GTRFQNRGYDARLELTHR----
M. catarrhalis    IRASMGKVDYHHDEIDGGEK-----TSFFDNQANVWRLEASHTPIHT
M. haemolytica    AKISANYVDYHDEKDGKRV-----ENYFKNKGNLRFELVHK----
P. multocida      VRFSIAKVGYRHDEKSGAIS-----DNSFKNKGY SARVEFLHQ----
N. meningitidis   LRVHLNRNDYRHDEKAGDAV-----ENFFNQTONARIELRHQ----
:      . * * : * .      . * *      * * *

A. baumannii      PLGELTGILGLQYLEQDNSALSPVHSQEGHTTYLDTQQLLNRNVTKNFVSGLEKYNW-N
A. pleuropneumoniae PLGGLTGVMGVQYQTLQSSMHAPKD-----REVKFP LVENTNKQMSLFGIEQYMW-D
H. parasuis       PIGGLTGMFGVQYQTLQSSANTPNN-----REVQWPLVDNRNKQISLFALEQYAW-D
B. pertussis      PLYGWHGVVGVQTSYSDFRA-----TGEEAFLPRSKTRAHGLPLLEHYRW-A
M. catarrhalis    PMGKFSGVFVGYLTSKNSGLVPPRYEDG--NKQDTQNILHNNKTKTGSVWFEEYKPD
M. haemolytica    EWKGLKGAIGVQYTNQSTSALEASRAA--KVFNKQPLNPNPKTKLWSLFAIERLNL-G
P. multocida      PIAGVSLGILGLSHVYQDSYALDNHTL-----EYRKQNLSDHTAQOQLPLMEHVEL-G
N. meningitidis   PIGRLKGSWGVQYLQKSSALSASIS-----EAVKQPMLLDNKVQHYSPFQVEQANW-D
      * * :      .      : *      . * .

A. baumannii      DFTFELGARIEKQKVSMDYDIEKIKDSMKPWPKNKYNSPYVEKNNKIRAQNLK-SILEAVQ
A. pleuropneumoniae NFALFAGRVKQKIEIEYDRNEIKRLQDHYRIS-----GGK-QVEPDL S
H. parasuis       NFATELGLRTEKQNIHIDYDLAKIQKQKFNERT-----YGK-QVDPDL S
B. pertussis      DWRFELGARQDWQRVSPQ-----SGAP
M. catarrhalis    KLTVDAAARIEKQTIIMDYDKDAIYQSLNLGLATAHEPDI-----RFRLLDSGTLN
M. haemolytica    DFTFELSGRAERQKIAMDYDVKLIDRWLGFNT-----PMPNLD
P. multocida      KWQFDIGGRVEKQRIAMKYHFNVPKDEQP-----PEELTR
N. meningitidis   NFTLEGGVRVEKQKASIQYDKALIDREYNNH-----PLPDLG
      . . : * : * .

A. baumannii      PNKETAFSYAGTVHWRFAFN YILSLTGTHQERLPNAQEMYTHGMHLATNSFEIGNRFLRK
A. pleuropneumoniae PYNQNA YAYSSTLNWFFHPDYQLSFTASHNERFPTPMELY YHGQHIATNSFEYGNKDLKK
H. parasuis       DYDEKAI SYTGAFNWFHPDYQLSFTASHNERLPTPMELY YHGQHLATNSFEYGNKDLKK
B. pertussis      ASRTAGTSLSAAA IWFAPQYSLALS SVRSQR LPSAQELYADGVHLATNTYIEIGDPGLDR
M. catarrhalis    PKKQTARSYAVGTHLQLTPKHKLSLNL SHQERLPNAQELYAHGMHLATNSFEIGNRFLNK
M. haemolytica    PHKDKGYSYSFATHWYFAPNHKLT LNAAHQERLPNAQELYAHGKHIALNAFEAGNKNLKK
P. multocida      PHKSKAYSALSANYQLNEHQHFMIVSHQERLPNAQELYAHGKHIALNAFEAGNKNLTK
N. meningitidis   AHRQTARSFALSGNWFYTPQHKL SLTASHQERLPSTQELYAHGKHIALNAFEVGNKHLNK
      . : :      . : : : : : : : * : * * * * * : * :

A. baumannii      EKSNNLEISLAYKDDLLDYQIISTYYYDFDNYIYLQTLNEVL-----GTTKVRDQHT
A. pleuropneumoniae EQSNNVELGLGYQTERVGYKVNYYNHFKNYIYENENLFR-----ENQ
H. parasuis       EISNNFELGLGYHTEKLDYKLS TYNNFDNYIYNETLYR-----SNN
B. pertussis      ETSRNVDLTLRKHS GDTTFSVSAFHNRVKNYIYANTLDR-----YED
M. catarrhalis    EKSNNIDLGLTFQGDKWDYRLGGYHYDFDNYVFLQTL S QYK-----QGLRGMRHDKD
M. haemolytica    ERSNQIELSLAYVGDKWDYKLNLYHTRYGNYIYPLTLNDNR-----GPKSFTDEYN
P. multocida      ERSNNVELGWG YTGELKGIKLSGYYQ QFSNYIYAAI LNNKTS CPWRPNRSCLRS L SDDYP
N. meningitidis   ERSNNIELALGYEGDRWQYNLALYRNRFGNYIYAQTLNDGR-----GPKSIEDDSE
* * . : : :      : :      * : :      *

A. baumannii      LRINHYSQSAANFYGLEGNIGYQFNSVYHGS LFGDYVKGRLTNLPDAVIAYDIWNRE---
A. pleuropneumoniae LFMRRYNQAKARFYGIEAEASYRFNDKYQATIFPGDMVGRWLTNLPPLTVNSDYSVFK---
H. parasuis       LFMRRYNQAKATFYGLEGI INYRFTPDYQFSVFGDMVKGK LKQLPDIKGLNDVYGEPI LN
B. pertussis      FRLIEYTRDAEFTGVEGEVHRHFGKVFSAAVFGDYVRGRLTG-----
M. catarrhalis    LKTARYEQAAAKFYGFDVNI GYQINDVYHVALFGDYIRGKLTNLPD KKRTRDAYGN----
M. haemolytica    LKVNRYYQGEARFSGAEGEIGYLF TPNYRLAVFGDYVRGKLVNLPNIAMS YNIW TGE---
P. multocida      LRLYRYNQAKAKIYGLEAEVSYQISSTHSVSI FGDYVRGKLDPLSP LIGYKIYNE---
N. meningitidis   MKLVRYNQSGADFYGAEGE IYFKPTPRYRIGVSGDYVRGRLKNLPSLPGREDAYGN---
:      . * * * : * :      .      : * * : * *

A. baumannii      -----PTLAPQKDRYTPRLPPARLGT RLKADFDES LKGEIEYYRV
A. pleuropneumoniae -DYLPKDAKPG-----EDYLIYRADQNTPRTPPVR LGFRFNAEFTPNWSGDLELIRT
H. parasuis       PDYDPEYDEPEDQYRYPYLGEMIKQADRVSPRLPP IRLGARFNAQLTENLSG SVWMMKV
B. pertussis      -----GGGNLPRI PAARLGVRADAQWQ--NWAGGVEYFHV
M. catarrhalis    -----RP-----LIKQPD SHTPRLPPKRLGMKLTANVNANW SGFLEYRHT
M. haemolytica    -----V-----DKWASQPD ISAPRI PPLRLGARFNADFNL NWSGMLEYYRV
P. multocida      -NYDMVG VQP-----TGWEKQPDGNAPRMS PMRLG I KWNAYFDNGI SFNTQLYRV
N. meningitidis   -----RP-----FIAQDDQNA PRVPAARLGFHLKASLTDRIDANLDYYRV
      . * * . * * : *      : :

```

```

A. baumannii          FKQDNISKFEQVTSGYNMLNMTLAYKNKLSHT--EYDLFFKANNLLDQKVYAHETFLLPYI
A. pleuropneumoniae FTQRRTSQLEYITEGNTMLNIGVAYSNKWKDL--DYKISLNGTNLLNQPVYIHTSYHQFV
H. parasuis          FTQNKVSKLESSTKGYQLLNASLNRYRRQIKGV--EYTVSLTGNNLLNQAVYIHNSYHPYV
B. pertussis         YRQDDIAAYESSTPGYDMVNATIRYRGKLDRT--AYEIIYLRGNNLLNKLAFNHASFISTV
M. catarrhalis       FKQDKLANFERPTPAHNLVNLGLNYQHKPSHQAGSVQVFFNANNLLNDKVF AHETFFPDM
M. haemolytica       FAQKKVSKYEQVTPGHHQVNLGVITYSNHFNQT--EYQVFLKVDNLLNQKMYQHASYLPHI
P. multocida         FAQNKVARLETPTKGHTMLNLGMSYDGKMGNN--EYTLFANVNNVLSRVYNHTSFLSYI
N. meningitidis     FAQNKLARYETRTPGHHMLNLGANYRRNTRYG--EWNWYVKADNLLNQSVYAHSSFLSDT
: * : * * . : * * : * : * :

```

```

A. baumannii          -PQIGRNFSLGLNLF
A. pleuropneumoniae -PQTGRNFILVVVKF
H. parasuis          -PQMGRNFILGLDLSF
B. pertussis         APLPGRSVLLGVRLTY
M. catarrhalis       -PQMGRNFMLGANFKF
M. haemolytica       -PQMGRNAMLGMNLSF
P. multocida         -PQSGGLNLVGMNFKF
N. meningitidis     -PQMGRSFTGGVNVKF
* * . . .

```