



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 503**

51 Int. Cl.:
C07K 14/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02777592 .3**

96 Fecha de presentación : **06.09.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1423419**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

54 Título: **Expresión híbrida y en tándem de proteínas de *Neisseria*.**

30 Prioridad: **06.09.2001 GB 0121591**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
Via Fiorentina 1
53100 Siena, SI, IT

72 Inventor/es: **Pizza, Mariagrazia**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 503 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

Todos los documentos citados en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

5 CAMPO TÉCNICO

Esta invención está en el campo de la expresión de proteínas. En particular, se refiere a la expresión de proteínas de *Neisseria* (por ejemplo, *N. gonorrhoeae* o, preferiblemente, *N. meningitidis*).

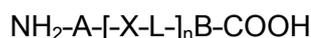
10 TÉCNICA ANTECEDENTE

Las referencias 1 y 2 describen planteamientos alternativos y mejorados para la expresión de proteínas de *Neisseria* desveladas en las referencias 3 a 6. Uno de tales procedimientos es para producir proteínas híbridas en las que dos o más proteínas de *Neisseria* se expresan como una única cadena polipeptídica. Este planteamiento ofrece dos
15 ventajas. Primero, una proteína que puede ser inestable o escasamente expresada sobre sí mismo se puede asistir mediante la adición de una pareja híbrida adecuada que vence el problema. Segundo, la fabricación comercial se simplifica ya que solamente se necesita emplear una expresión y purificación con el fin de producir dos proteínas útiles separadamente.

Es un objeto de la presente invención proporcionar además planteamientos alternativos
20 y mejorados para la expresión de proteínas de *Neisseria*.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

La invención proporciona una proteína híbrida que tiene la fórmula:



25 En la que L es una secuencia de aminoácidos de engarce opcional, A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional, B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional, y n = 2,

(i) X₁ es

30 (a) la secuencia de aminoácidos de *N. meningitidis* 936 (SEQ ID 2884 del documento WO99/57280)

```

1  MKPKPHTVRT  LIAAIFSLAL  SGCVSAVIGS  AAVGAKSAVD  RRTTGAQTDD
51  NVMALRIETT  ARSYLRQNNQ  TKGYPQISV  VGYNRHLLLL  GQVATEGEKQ
101 FVGQIARSEQ  AEGVYNYIT  VASLPRTAGD  IAGDTWNTSK  VRATLLGISP
151 ATQARVKIVT  YGNVTYVMGI  LTPEEQAQIT  QKVSTTVGVQ  KVITLYQNYV
201 QR, o

```

(b) una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de (a); y

(ii) X_2 es

(a) la secuencia de aminoácidos de *N. meningitidis* 741 (SEQ ID 2536 del documento WO99/57280)

5

```

1  VNRTAFCCLS LTTALILTAC SSGGGGVAAD IGAGLADALT APLDHKDKGL
51  QSLTLDQSVR KNEKLKLAHQ GAEKTYGNGD SLNTGKLKND KVSFRDFIRQ
101 IEVDGQLITL ESGEFQVYKQ SHSALTAFTQ EQIQDSEHSG KMLAKRQFRI
151 GDIAGEHTSF DKLPEGGRAT YRGTAFGSDD AGGKLTYTID FAAKQGNKGI
201 EHLKSPENLV DLAAADIKPD GKRHAVISGS VLYNQAEEKGS YSLGIFGGKA
251 QEVAGSAEVK TVNGIRHIGL AAKQ,

```

(b) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de (a) con una supresión N-terminal hasta e incluyendo el resto 26 de la secuencia de aminoácidos of (a); o

(c) una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de (a) o (b).

10

Proteínas híbridas

De este modo la invención proporciona un procedimiento para la expresión simultánea de dos proteínas de Neisseria, en el que dichas dos o más proteínas están unidas de manera que se traducen como una única cadena de polipéptido. En general, las proteínas híbridas de la invención se pueden representar por la fórmula: $NH_2-A-[-X-L-]_n-B-COOH$ en la que X es una secuencia de aminoácidos, L es una secuencia de aminoácidos de engarce opcional, A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional, B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional, y $n = 2$.

15

20

Los restos -X-

Los 2 restos -X-son 741, y ; o

(b) una secuencia de aminoácidos que tiene 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de (a)

25

Si un resto -X- tiene una secuencia de péptidos guía en su forma de tipo salvaje, esta se puede incluir u omitir en las proteínas híbridas descritas en la forma de longitud completa, está preferiblemente en el extremo C-terminal y una proteína híbrida; se va a usar en el extremo N, si se prefiere usar una forma AG de 741.

Los restos -L-

Para cada uno de los n ejemplos de [-X-L-], la secuencia de aminoácidos de engarce -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n = 2$ el híbrido puede ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, etc.

La (s) secuencia (s) de aminoácidos (s) de engarce **-L-** típicamente será corta (*por ejemplo*, 20 o menos aminoácidos es decir, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias de péptidos cortas que facilitan clonación, engarces de poliglicina (*es decir*, GIY_n donde $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), y etiquetas histidina (*es decir*, His^n donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos de engarce adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. Un engarce útil es GSGGGG (SEQ ID 27), formándose el dipéptido Gly-Ser a partir de un sitio de restricción BamHI, ayudando de este modo a la clonación y manipulación, y siendo el terapéptido GIY4 un engarce típico de poli-glicina.

Si X_{n+1} es una proteína ΔG y L_n es un engarce glicina, esto puede ser equivalente a X_{n+1} , no siendo una proteína ΔG y estando L_n ausente.

El resto -A-

-A- es una secuencia de aminoácidos N-terminal. Esta típicamente será corta (*por ejemplo*, 40 o menos aminoácidos es decir, 35, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias guía para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación o purificación (*por ejemplo*, etiquetas histidina es decir, His_n , donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos N-terminal adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Si X_1 carece de su propio extremo N metionina, -A- puede ser un resto de metionina.

El resto -B-

-B- es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional. Esta típicamente será corta (*por ejemplo*, 40 o menos aminoácidos es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 45, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación o purificación (*por ejemplo*, que comprenden etiquetas histidina es decir, His_n donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), o secuencias que potencian la estabilidad

de la proteína. Otras secuencias de aminoácidos C-terminal adecuadas serán apreciadas por los expertos en la técnica

Formas polimórficas de proteínas

5

La invención puede usar secuencias de aminoácidos de cualesquiera cepas de *N. meningitidis*. Referencias a una proteína particular incluyen por tanto la proteína de cualquier cepa. Las variaciones de secuencia entre cepas se incluyen dentro de (b)

Las secuencias de referencia del serogrupo B de *N. meningitidis* incluyen:

10 El listado de secuencias en el presente documento incluye formas polimórficas de proteínas 741 (SEO ID 1 - 22) y que se han identificado:

Serogrupos y cepas

15 Las proteínas preferidas de la invención comprenden restos -X- que tienen una secuencia de aminoácidos encontrada en el serogrupo B de *N. meningitidis*. Dentro de una única proteína de la invención, los restos -X- individuales pueden ser de una o más cepas. Por ejemplo, X₂ puede ser de la misma cepa que X₁ o de una cepa diferente.

20 Dentro del serogrupo B, los restos de -X- preferidos son de las cepas 2996, MC58, 95N477, o 394/98. La cepa 95N477 algunas veces se denomina en el presente documento como 'ET-37', siendo ésta su tipo electroforético. La cepa 394/98 algunas veces se denomina en el presente documento como 'nz', ya que es una cepa de Nueva Zelanda.

741 es preferiblemente de las cepas del serogrupo B MC58, 2996, 394/98, o 95N477, o de la cepa del serogrupo C 90/18311.

25 Las cepas se indican como un subíndice *por ejemplo*, 741_{MC58} es proteína 741 de la cepa MC58. Salvo que se establezca de otra manera, las proteínas mencionadas en el presente documento (*por ejemplo*, sin subíndice) son de la cepa 2996 de *N. meningitidis*, que se puede tomar como una cepa 'referencia'. Sin embargo, se apreciará, que la invención no se limita en general a la cepa. Como se ha mencionado anteriormente, las referencias generales a una proteína se pueden tomar para incluir una proteína de cualquier cepa. Esto típicamente
30 tendrá identidad de secuencia a 2996 de 90% o más (por ejemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más).

Secuencias.

35 La invención también proporciona una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de las SEO ID 1 a 22. También proporciona proteínas y ácido nucleico que tienen

identidad de secuencia a éstas. Como se ha descrito anteriormente, el grado de 'identidad de secuencia' es mayor que 90%,

La invención proporciona ácido nucleico que codifica tales proteínas.

5 La invención también proporciona ácido nucleico que codifica proteínas de acuerdo con la invención.

Se debe también apreciar que la invención proporciona ácido nucleico que comprende secuencias complementarias a las descritas anteriormente (*por ejemplo*, para propósitos no codificantes o de sonda).

10 Ácido nucleico de acuerdo con la invención puede, de hecho, prepararse de muchas formas (*por ejemplo*, mediante síntesis química, de genotecas genómicas o de ADNc, de los propios organismos *etc.*) y puede tomar diversas formas (por ejemplo, vectores, sondas de una sola cadena, de doble cadena, *etc.*).

15 Además, el término "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen estructuras centrales modificadas, y también ácidos nucleicos peptídicos (PNA) *etc.*

Mezclas

La invención también proporciona una composición que comprende dos o más (*es decir*, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7) de las siguientes proteínas:

20 (1) 287

(2) 741

(3) ORF46.1

(4) 961

(5) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-I}_n\text{-B-COOH}]$, en la que $n = 2$, $X_1 = 287$, $X_2 = 953$

25 (6) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-I}_n\text{-B-COOH}]$, en la que $n = 2$, $X_1 = 287$, $X_2 = 919$

(7) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-I}_n\text{-B-COOH}]$, en la que $n = 2$, $X_1 = 287$, $X_2 = 961$

La mezcla una o ambas de las siguientes proteínas, o bien en combinación con dos o más de (1) a (7), o en combinación con solamente una de (1) a (7):

(8) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que $n = 2$, $X_1 = 287$, $X_2 = 741$

30 (9) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que $n = 2$, $X_1 = 936$, $X_2 = 741$

Cuando las proteínas 287 y 741 están incluidas en la mezcla (*es decir*, en la proteína 1, 2, 5, 6, 7 u 8), pueden estar en la forma ' ΔG '

Cuando la proteína 961 está incluida, preferiblemente está en la forma de '961 c' en la que la guía del extremo N y anclaje de la membrana del extremo C no están [*por ejemplo*, véanse las referencias 1, 2 y 11].

35

Una mezcla preferida comprende las siguientes tres proteínas:

(1) 961c, preferiblemente 961c₂₉₉₆ (*por ejemplo*, SEQ ID 31 en el presente documento);

(2) NH₂-A-[-X-L-]_n-B-COOH, en la que *n* es 2, -X₁- es ΔG287 (preferiblemente ΔG287_{NZ}), -X₂- es 953 (preferiblemente 953₂₉₉₆) que carece de su péptido guía, -L₁- es GSGGGG, y -A- comprende una metionina de extremo N (*por ejemplo*, -A- es M o MA) (*por ejemplo*, las SEQ ID 28 y 29 en el presente documento); y

(3) NH₂-A-[-X-L-]_n-B-COOH, en la que *n* = 2, X₁ = 936 (preferiblemente 936₂₉₉₆), X₂ = ΔG741 (preferiblemente ΔG741_{MCS8})'

10 L₁ = GSGGGG (*por ejemplo*, SEQ ID 30 en el presente documento).

Las mezclas también pueden comprender vesículas de la membrana externa de *N.meningitidis*.

Huésped heterólogo

15 Aunque la expresión de las proteínas de la invención puede tener lugar en *Neisseria*., la presente invención preferiblemente utiliza un huésped heterólogo. El huésped heterólogo puede ser procariótico (*por ejemplo*, una bacteria) o eucariótico. Es preferiblemente *E.coli*, pero otros huéspedes adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (*por ejemplo*, *M. tuberculosis*), levaduras *etc.*

20

Vectores etc

25 La invención proporciona (a) ácido nucleico que codifica la proteína como se ha descrito anteriormente (b) vectores que comprenden estas secuencias de ácido nucleico (c) células huésped que contienen dichos vectores (d) composiciones que comprenden las proteínas o ácidos nucleicos de la invención, que pueden ser adecuados como composiciones no inmunogénicas (*por ejemplo*, vacunas) o como reactivos de diagnóstico (e) estas composiciones para uso como medicamentos (*por ejemplo*, como vacunas) o como reactivos de diagnóstico (f) el uso de estas composiciones en la fabricación de (1) un medicamento para tratar o prevenir la infección debida a bacterias de *Neisseria* (2) un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de bacterias de *Neisseria* o de anticuerpos inducidos contra bacterias de *Neisseria*, y / o (3) un reactivo que puede inducir anticuerpos contra bacterias de *Neisseria* y (g) un procedimiento de tratamiento de un paciente, que comprende la administración al paciente

30

35 de una cantidad terapéuticamente eficaz de estas composiciones.

La implementación de la invención típicamente implicará las etapas básicas de: obtención de un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína; obtención un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína; y liga al primer y segundo ácidos nucleicos. El ácido nucleico resultante se puede insertar en un vector de expresión, o puede ser ya parte de un vector de expresión.

Para mejorar la solubilidad, la purificación de las proteínas híbridas pueden implicar las técnicas de plegado descritas en el presente documento.

Composiciones inmunogénicas y medicamentos

Las composiciones de la invención son preferiblemente composición inmunogénica, y son más preferiblemente composiciones de vacuna. El pH de la composición está preferiblemente entre 6 y 7. El pH se puede mantener mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril.

Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser o bien profilácticas (*es decir*, para prevenir la infección) o terapéuticas (*es decir*, para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas.

La invención también proporciona una composición de la invención para uso como un medicamento. El medicamento es preferiblemente capaz de inducir una respuesta inmune en un mamífero (*es decir*, es una composición inmunogénica) y es más preferiblemente una vacuna.

La invención también proporciona el uso de una composición de la invención en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un mamífero. El medicamento es preferiblemente una vacuna.

La invención también proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune en un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición de la invención. La respuesta inmune es preferiblemente protectora. El procedimiento puede inducir una respuesta de recuerdo.

El mamífero es preferiblemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferiblemente un niño (*por ejemplo*, a niño pequeño o bebé); cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferiblemente un adulto. Una vacuna propuesta para niños también se puede administrar a adultos *por ejemplo*, para evaluar seguridad, dosificación, inmunogenicidad, *etc.*

Estos usos y procedimientos son preferiblemente para la prevención y / o tratamiento de una enfermedad provocada por una *Neisseria* (*por ejemplo*, meningitis, septicemia, gonorrea *etc.*). La prevención y / o tratamiento de meningitis bacteriana se prefiere.

Componentes adicionales de la composición

La composición de la invención típicamente, además de los componentes mencionados anteriormente, comprenderán uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, que incluye cualquier vehículo que él mismo no induce la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trehalosa (documento WO00/56365) y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. De manera adicional, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes y emulsionantes, sustancias de tamponación de pH, y similares. Una descripción completa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según sea necesario. Por cantidad inmunológicamente eficaz', significa que la administración de esa cantidad a un individuo, o bien en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (*por ejemplo*, un primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración del doctor que está tratando la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caerá dentro de un intervalo relativamente grande que se puede determinar mediante ensayos de rutina. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis individual o un programa de dosis múltiple (*por ejemplo*, incluyendo dosis de refuerzo). La vacuna se puede administrar junto con otros agentes inmunorreguladores.

La vacuna se puede administrar junto con otros agentes inmunorreguladores.

La composición puede incluir otros adyuvantes además de (o en lugar de) la sal de aluminio. Los adyuvantes preferidos para potenciar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a: (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes tales como muramil péptidos (véase más adelante) o componentes de la pared de célula bacteriana), tal como por ejemplo (a) MF59™ (documento WO90/14837 capítulo 10 en la ref. 13), que contiene 5% de Escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span

85 (conteniendo opcionalmente MTP-PE) formulado en partículas submicrónicas usando un microfluidificador, (b) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado por plurónico, y thr-MDP o bien microfluidificado en una emulsión submicrónica o agitado en un aparato Vortex para generar una emulsión de tamaño de

5 partícula mayor, y (c) sistema de adyuvante RibitTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de Escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana a partir del grupo que consta de monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM); (2) se pueden usar adyuvantes de saponina, tal como QS21 o Stimulon StrnulonTM

10 (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas a partir de ellos tal como los ISCOM (complejos inmunoestimulantes), dichos ISCOMS pueden estar desprovistos de detergente adicional *por ejemplo*, el documento WO00/07621; (3) Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (4) citoquinas, tales como interleuquinas (*por ejemplo*, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636),

15 *etc.*), interferones (*por ejemplo*, interferón gamma), factor estimulador de la colonia de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), *etc.*; (5) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) *por ejemplo*, documentos GB-2220221, EP-A- 0689454; (6) combinaciones de 3dMPL con, *por ejemplo*, QS21 y / o emulsiones aceites en agua *por ejemplo*, documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A0761231; (7) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG [Krieg Vaccine 2000, 19, 618 - 622; Krieg Curr- opin Mol Ther 2001

20 3: 15 - 24; Roman et al., Nat. Med., 1997, 3, 849 - 854; Weiner et al., PNAS USA, 1997, 94, 10833 - 10837; Davis et al., J. 30 Immunol., 1998, 160, 870 - 876; Chu et al., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623 - 1631; Lipford et al, Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340 - 2344; Moldoveanu et al., Vaccine, 1988, 16, 1216 - 1224, Krieg et al., Nature, 1995, 374, 546 - 549; Klinman et al.,

25 PNAS USA, 1996, 93, 2879 - 2883; Bailas et al., J. Immunol., 1996, 157, 1840 - 1845; Cowdery et al., J. Immunol., 1996, 156, 4570 - 4575; Halpern et al., Cell. Immunol., 1996, 167, 72 - 78; Yamamoto et al., Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866 - 873; Stacey et al., J. Immunol., 1996, 157, 2116 - 2122; Messina et al., J. Immunol., 1991, 147, 1759 - 1764; Yi 35 et al., J. Immunol., 1996, 157, 4918 - 4925; Yi et al., J. Immunol., 1996, 157, 5394 - 5402; Yi et al. J. Immunol

30 1998, 160, 4755 - 4761; y Yi et al., J. Immunol., 1998, 160, 5898 - 5906: Solicitudes de patentes Internacionales WO96/02555, WO98/6247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581] *es decir*, que contiene al menos un dinucleótido CG, opcionalmente usándose 5- metilcitosina en lugar de citosina; (8) a polioxietilen éter o un polioxietilen éster *por ejemplo*, el documento WO99/52549; (9) un tensioactivo de polioxietilen sorbitán éster en combinación con un octoxinol (*por ejemplo*, documento WO01/21207) o un

35

tensioactivo de polioxietilén alquil éter o éster en combinación con al menos un tensioactivo adicional no iónico tal como un octoxinol (*por ejemplo*, documento WO01/21152); (10) un oligonucleótido inmunoestimulante (*por ejemplo*, un oligonucleótido CpG) y una saponina *por ejemplo*, documento WO00/62800; (11) un inmunoestimulante y una partícula de sal de metal *por ejemplo*, documento WO00/23105; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua *por ejemplo*, documento WO99/11241; (13) una saponina (*por ejemplo*, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) *por ejemplo*, documento WO98/57659; (14) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición.

Los muramil péptidos incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nomuramil-L-alanil-D-isoglutamina (no-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina MTP-PE), *etc.*

Antígenos adicionales

Los antígenos adicionales que se pueden incluir en la composición de la invención incluyen:

- una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) de serogrupo B de *N. meningitidis*, tales como las descritas en las refs. 14, 15, 16, 17 *etc.*

- un antígeno de sacárido de serogrupo A, C W135 y / o Y de *N. meningitidis*, tal como el oligosacárido descrito en la ref. 18 del serogrupo C [véase también la ref. 19] o los oligosacáridos de la ref. 20.

- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [*por ejemplo*, refs. 21, 22, 23].

- un antígeno de proteína de *Helicobacter pylori* tal como CagA [*por ejemplo*, 24], VacA [*por ejemplo*, 24], NAP [*por ejemplo*, 25], HopX [*por ejemplo*, 26], HopY [*por ejemplo*, 26] y / o ureasa.

- un antígeno de virus de hepatitis A, tal como virus inactivado [*por ejemplo*, 27, 28].

- un antígeno de virus de hepatitis B, tales como antígenos de superficie y / o núcleo [*por ejemplo*, 28, 29].

- un antígeno de virus de hepatitis C [*por ejemplo*, 30].

- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y / o aglutinógenos 2 y 3 [*por ejemplo*, refs. 31 y 32].

- un antígeno de difteria, tal como un toxoide de difteria (*por ejemplo*, capítulo 3 de la ref. 33] *por ejemplo*, el mutante CRM197 [*por ejemplo*, 34].

- un antígeno de tétanos, tal como un toxoide de tétanos [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 33].

- a antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 19].

- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo, 3, 4, 5].

5 - un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41].

- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 42].

- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 43].

- antígeno (s) de polio [por ejemplo, 44, 45] tales como IPV u OPV.

10 - antígeno (s) de rabia [por ejemplo, 46] tal como virus inactivado liofilizado [por ejemplo, A7, RabAvert™]

- antígenos de sarampión, paperas y / o rubéola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de ref. 33].

- antígeno (s) de influenza [por ejemplo, capítulo 19 de la ref. 33], tales como las proteínas de superficie de hemaglutinina y / o neuraminidasa.

15 - un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 48].

- un antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus del grupo B) [por ejemplo, 49, 50].

- un antígeno de sacárido de *Streptococcus agalactiae*

20 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus del grupo A) [por ejemplo, 50, 51, 52].

- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 53].

La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales.

25 Cuando se usa un antígeno de sacárido o carbohidrato antígeno, está preferiblemente conjugado a una proteína vehículo con el fin de potenciar la inmunogenicidad [por ejemplo, refs. 54 a 63]. Las proteínas vehículo preferidas son toxinas o toxoides bacterianas, tal como toxoides de difteria o tétanos. El toxoide de difteria CRM197 se prefiere particularmente. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [por ejemplo, ref. 64], péptidos sintéticos [por ejemplo, 65, 66], proteínas de choque térmico [por ejemplo, 67], proteínas pertussis [por ejemplo, 68, 69], proteína D de *H. influenzae* [por ejemplo, 70], toxina A o B de *C. difficile* [por ejemplo, 71], etc. Cuando una mezcla comprende

30 sacáridos capsulares de tanto los serogrupos A como C, se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenA: sacárido MenC es mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10: o más). Sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* se pueden conjugar a las mismas o diferentes proteínas vehículo.

Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier engarce adecuado si es necesario.

5 Los antígenos de proteína tóxicos pueden estar destoxificados cuando sea necesario (*por ejemplo*, destoxificación de toxina de pertussis mediante medios químicos y / o genéticos [32]).

10 Cuando un antígeno de difteria está incluido en la composición se prefiere también que incluya antígeno de tétanos y antígeno de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de tétanos se prefiere también que incluya antígenos de difteria y pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno pertussis se prefiere que también incluya antígenos de difteria y de tétanos.

15 Los antígenos están preferiblemente mezclados con (y más preferiblemente adsorbidos a) una sal de aluminio (*por ejemplo*, fosfato, hidróxido, hidroxifosfato, oxihidróxido, ortofosfato, sulfato). La sal puede tomar cualquier forma adecuada (*por ejemplo*, gel, cristalina, amorfa *etc.*).

Los antígenos en la composición típicamente estarán presentes a una concentración de al menos 1µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado se suficiente para provocar una respuesta inmune contra ese antígeno.

20 Como una alternativa para usar antígenos de proteínas en la composición de la invención, se puede usar ácido nucleico que codifica el antígeno [*por ejemplo*, refs. 72 a 80]. Los componentes de proteína de las composiciones de la invención de este modo se pueden reemplazar por ácido nucleico (preferiblemente ADN *por ejemplo*, en la forma de un plásmido) que codifica la proteína.

25 **Definiciones**

El término "que comprende" significa "que incluye" así como "que consiste" *por ejemplo*, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional *por ejemplo*, X + Y.

30 El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 muestra una alineación de veintitrés secuencias para la proteína 741. éstas son las SEQ ID 1 a 22 más la secuencia de MC58.

5 Figura 2 muestra proteínas híbridas y en tándem de la invención.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

Proteínas híbridas - X₁ = 961c o 961cL

10 Además de las descritas en las referencias 1 y 2, ocho proteínas híbridas con o bien 961c o 961cl (es decir, 961c + péptido guía) en el extremo N se construyeron:

n°	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	961c	-	287	-
2	2		-	287	(His) ₆
3	2		-	230	(His) ₆
4	2		-	936	(His) ₆
5	2	961cL	-	287	-
6	2		-	287	(His) ₆
7	2		-	230	(His) ₆
8	2		-	936	(His) ₆

15 Estas proteínas se unieron con adyuvantes o bien con adyuvante completo de Freund (FCA) o 3,3 mg/ml de alumbre y se usó para inmunizar ratones. Los sueros resultantes se ensayaron contra diversas cepas de Neisseria usando el ensayo bactericida. Las titulaciones que usan la proteína n° 8 eran como sigue:

Cepa (serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44176 ^(B)	F6124 ^(A)
Hidróxido de Al	8192	8192	512	1024	<16
FCA	65536	16384	>2048	>2048	8192

Las valoraciones obtenidas después de inmunización con 961c-741 [refs. 1 y 2] fueron como sigue:

Cepa (serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44176 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
Hidróxido de Al	65536	32768	4096	>32768	16384	>2048
FCA	>16384	262144	4096	>16384	-	>2048

5

Estos resultados se pueden mejorar mezclando 961c-741 con ORF46.1 o con Δ G287 - 919.

10 Los resultados obtenidos después de inmunización con las proteínas descritas en las refs. 1 y 2, ensayados contra la cepa homóloga, fueron como sigue:

n	X1	L1	X2	L2	Valoración Bactericida		ELISA	
					FCA	Alumbre	FCA	Alumbre
2	961c	-	ORF46.1	(His) ₆	32768	1024	>10935 0	>109350
			741		>16384	8192	>10935 0	>109350
			936		>32768	8192	>10935 0	>109350

Los resultados obtenidos después de inmunización con las proteínas descritas en las refs. 1 y 2, fueron como sigue:

15

n	X1	L1	X2	L2	Valoración Bactericida	ELISA
---	----	----	----	----	------------------------	-------

					FCA	Alumbre	FCA	Alumbre
2	ORF46.1	-	961	(His) ₆	8192	8192	21558	>109350
		-	961 c	(His) ₆	8192	128	9020	76545

Proteínas híbridas - X₁ = 936

5 Además de las descritas en las referencias 1 y 2, se construyeron siete proteínas híbridas con 936 en el extremo N :

nº	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
3	2	936	-	741 _{ET37}	(His) ₆
4	2		-	741 _{MC58}	(His) ₆
5	2		-	741 _{90/18311}	(His) ₆
6	2		-	741 _{95N477}	(His) ₆
7	2		-	741	(His) ₆

10 Estas proteínas se unieron por adyuvante o bien con adyuvante completo de Freund (FCA) o 3 mg/ml de alumbre y se usaron para inmunizar ratones. Los sueros resultantes se ensayaron contra diversas cepas de Neisseria usando el ensayo bactericida.

Cepa (serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44176 ^(B)	F6124 ^(A)
Hidróxido de Al	16384	32768	1024	2048	<1,6
FCA	65536	65536	>2048	8192	2048 (36%)

15

Las valoraciones usando la proteína nº 4 fueron como sigue:

Cepa (serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44176 ^(B)	F6124 ^(A)

Hidróxido de Al	256	>262144	>2048	32768	8192
FCA	1024	>262144	>2048	>32768	>32768

Las valoraciones usando la proteína nº 7 fueron como sigue:

Cepa (serogrupo)	2996 (B)	MC58 (B)	394/98 (B)	44176 (B)	F6124 (A)	BZ133 (C)
Hidróxido de Al	256	130000	16000	32000	8000	16000

- 5 Los resultados obtenidos después de inmunización con las proteínas descritas en las refs. 1 y 2 contra la cepa homóloga, fueron como sigue:

<i>n</i>	X1	L1	X2	L2	Valoración Bactericida		ELISA	
					FCA	Alumbre	FCA	Alum
2	936	-	741	(His) ₆	1024	256	1466	5715
			936		>32768	>32768	>109350	>109350

10 *Mezclas de proteínas híbridas*

Los ratones se inmunizaron con tres proteínas unidas por adyuvante con hidróxido de aluminio, o bien individual o en combinación triple: (1) 287_{Nz}-953; (2) 936-741; y (3) 961c. La mezcla fue capaz de inducir altas valoraciones bactericidas contra diversas cepas:

15

	2996 (B)	MC58 (B)	NGH38	394/98 (B)	H44176 (B)	F6124 (A)	BZ133 (C)	C11 (C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000

(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000
Mezcla	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
(X)	4000	4000	1000	1000	>4000	1000	4000	n. d.

'-' indica que esta cepa no contienen el gen NadA

(X) era una combinación de la proteína 287 con las vesículas de membranas externas, para comparación.

Mirando los ratones individuales, la mezcla indujo altas y consistentes valoraciones bactericidas:

nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

5

nº	n	X1	L1	X2	L2
1	2	$\Delta G741_{MC58}$	-	741 _{MC58}	(His) ₆
2	2	$\Delta G287_{2996}$	(Gly) ₆	$\Delta G0287_{394/98}$	(His) ₆
3	2	$\Delta G287_{2996}$	(Gly) ₆	$\Delta G287_{2996}$	(His) ₆
4	2	$\Delta G287_{394/98}$	(Gly) ₆	$\Delta G287_{394/98}$	(His) ₆
5	2	$\Delta G287_{394/98}$	(Gly) ₆	$\Delta G287_{2996}$	(His) ₆

10 Variants alélicas - 741

Se encontraron veintidós secuencias polimórficas 741 (SEQ IO 1 a 22). Éstas y la secuencia de MC58 se alinean en la Figura 1.

TABLA 1

	Cepa	1343	Secuencia	Clasificación de la cepa
	72/00	+		ET5 B: 15: P1.7, 13,13a
	30/00	+		ET5 B: 15: P1.7,16
5	39/99	+		ET5 C: 15: P1.7, 16
	95330	+		ET5 B: 4: P1.15
	M4102	+		ET5 nd
	MC58(21)	+	+	ET5 B: 15: P1.7, 16b
	BZ169(7)	+	+	ET5 B:NT:P1.16
10	BZ83(19)	+		ET5 B:15:-.-
	Cepa	1343	Secuencia	Clasificación de la cepa
	CU385	+	+	ET5 B:4:P1.15
	220173I	+		ET8 NG:4:P1.15
	64/96	+	+	ET5 NG: 15: P1.7, 16 (vehículo)
15	220173I	+		ET5 B:4:P1.15 (vehículo)
	ISS1071	+		nd B:15:P1.7,16 (ET5?)
	BZ198(2)	+	+	lin.3 B:8:P1.1
	980-2543	+	+	lin.3 B:NT:P1.4
	16060	+	+	otra B:4: P1.14 (vehículo)
20	394-98	+		nd B:4:P1.4 (lin 3?)
	ISS1106	+		nd B:4:P1.4 (lin.3?)
	BZ133(10)	+	+	sub 1B:NT:-.-
	S3446	+	+	nd B:14:P1.23,14
	ISS1001	+	+	ndB:14:P1.13
25	241175I	+		otra NG:21 :P1.16 (vehículo)
	171274I	+		otra NG:15:- (vehículo)
	66/96	+		otra B:17:P1.15 (vehículo)
	961-5945	-		A4
	96217	-		A4
30	312294	-		A4
	90/18311 (24)	-		ET37
(cont.)				
	93/4286(25)	-		ET37
	M986	-		ET37
35	1000(5)	-		otra

	NGE28(13)	-	otro vehículo
	NGH38(14)	-	otro vehículo
	BZ232(18)	-	otra
	F6124(23)	-	sub III A:-.-
5	C11	-	C:-
	NMB	-	nd
	8047	-	nd
	ISS759	-	nd C:2b:P1.2
	ISS1113	-	nd C:2:P1.5
10	65/96	-	nd 4:P1.14
	2996(96)	-	nd B:2b:P1.5,2

REFERENCIAS (cuyos contenidos se incorporan por la presente por referencia)

- 1 - Solicitud de patente internacional WO01/64920.
- 15 2 - Solicitud de patente internacional WO01/64922.
- 3 - Solicitud de patente internacional WO99/24578.
- 4 - Solicitud de patente internacional WO99/36544.
- 5 - Solicitud de patente internacional WO99/57280.
- 6 - Solicitud de patente internacional WO00/22430.
- 20 7 - Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
- 8 - Solicitud de patente internacional WO00/66741.
- 9 - Solicitud de patente internacional WO00/71574.
- 10- Solicitud de patente internacional WO01/04316
- 11 - Solicitud de patente internacional PCT/IB02/03396.
- 25 12 - Comanducci et al. (2002) J Exp Med 195:1445 - 1454.
- 13 - Vaccine Design: subunit & adjuvant approach (1995) Powell y Newman (ISBN: 030644867X).
- 14 - Solicitud de patente internacional WO01/52885.
- 15 - Bjune et al. (1991) Lancet 338 (8775): 1093 - 1096.
- 30 16 - Fukasawa et al. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
- 17 - Rosenqvist et al. (1998) Dev. Biol. Stand. 92: 323 - 333.
- 18 - Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698.
- 19 - Costantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- 20 - Solicitud de patente internacional PCT/IB02/03191.
- 35 21 - Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.

- 22 - Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269 - 285, v.
- 23 - Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- 24 - Solicitud de patente internacional WO93/18150.
- 25 - Solicitud de patente internacional WO99/5331 O.
- 5 26 - Solicitud de patente internacional WO98/04702.
- 27 - Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187 - 1188.
- 28 - Iwarson (1995) *APMIS* 103: 321 - 326.
- 29 - Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl: S63-68 y 79 - 80.
- 30 - Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3: 901 - 915.
- 10 31 - Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334: 349 - 355.
- 32 - Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9: 232 - 238.
- 33 - *Vaccines* (1988) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0 - 7216 - 1946-0.
- 34 - Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19: 1 - 70.
- 35 - Solicitud de patente internacional WO02/02606.
- 15 36 - Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- 37 - Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- 38 - Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Suppl3): S524 - S527.
- 39 - Solicitud de patente internacional WO99/271 05.
- 40 - Solicitud de patente internacional WO00/27994.
- 20 41 - Solicitud de patente internacional WO00/37494.
- 42 - Solicitud de patente internacional WO99/28475.
- 43 - Ross et al. (2001) *Vaccine* 19: 4135 - 4142.
- 44 - Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- 45 - Zimmerman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59: 113 - 118, 125 - 126.
- 25 46 - Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl: S2 - 6.
- 47 - *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 16 de enero de 1998; 47(1): 12,19.
- 48 - McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl I:S101-107.
- 49 - Schuchat (1999) *Lancet* 353 (9146): 51 - 6.
- 50 - Documento WO02/34771.
- 30 51 - Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 227 - 43, viii.
- 52 - Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658 - 4663.
- 53 - Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357 (9264):1225 -1240; véanse también las páginas 1218 - 1219.
- 54 - Ramsay et al. (2001) *Lancet* 357 (9251): 195 - 196.
- 35 55 - Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2: S28 - 36.

- 56 - Buttery y Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34: 163 - 168.
 57 - Ahmad y Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.
 58 - Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47: 563 - 567.
 59 - European patent O477 508.
- 5 60 - Patente de Estados Unidos 5,306,492.
 61 - Solicitud de patente internacional WO98/42721.
 62 - Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularmente el vol. 10: 48 - 114.
 63 - Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 o 012342335X.
- 10 64 - Solicitud de patente europea 0372501.
 65 - Solicitud de patente europea 0378881.
 66 - Solicitud de patente europea 0427347.
 67 - Solicitud de patente internacional WO93/17712.
 68 - Solicitud de patente internacional WO98/58668.
- 15 69 - Solicitud de patente europea 0471177.
 70 - Solicitud de patente internacional WO00/56360.
 71 - Solicitud de patente internacional WO00/61761.
 72 - Robinson y Torres (1997) Seminars in Immunology 9:271-283.
 73 - Donnelly et al. (1997) Annu Rev Immunol 15: 617 - 648.
- 20 74 - Scott-Taylor y Dalgleish (2000) Expert Opin Investig Drugs 9: 471 - 480.
 75 - Apostolopoulos y Plebanski (2000) Curr Opin Mol Ther 2: 441 - 447.
 76 - Ilan (1999) Curr Opin Mol Ther 1: 116 - 120.
 77 - Dubensky et al. (2000) Mol Med 6: 723 - 732.
 78 - Robinson y Pertmer (2000) Adv Virus Res 55: 1 - 74.
- 25 79 - Donnelly et al. (2000) Am J Respir Crit Care Med 162 (4 Pt 2):S190 - 193.
 80 - Davis (1999) Mt. Sinai J. Med. 66: 84 - 90.
 81 - Parkhill et al. (2000) Nature 404: 502 - 506.

LISTADO DE SECUENCIAS**SEQ ID 1 - 741 de la cepa 1000**

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTTPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

5

SEQ ID 2 - 741 de la cepa 2201731 (codón de parada prematuro stop, mediante secuencia fiable)

MTRSKPVNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFOEQIQ
 DSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAQGNGKIEHLK
 SPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGKA

SEQ ID 3 - 741 de la cepa 90/18311 (incompleta)

GLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEV
 DGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKIN NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGK
 AFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLA
 LFGDRAQEIAGSATVKIREKVHET

10

SEQ ID 4 - 741 de la cepa L9314286 (incompleta)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEK LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDG
 KAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGEE
 KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 5- 741 de la cepa 2996

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKIN
 NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAQQGHGKIEHLKT
 PEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

15

SEQ ID 6 - 741 de la cepa 3D/DO

KDKGLQSLTLDQSVRKNEK LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QVYKQSHSALTAFOEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGK
 TYTIDFAAQGNGKIEHLK SPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGKAQEVAG
 SAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 7 - 741 de la cepa 312294

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKIN
 NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAQGHGKIEHLKT
 PEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 8 - 741 de la cepa 39/99 (incompleta)

DKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQ
 VYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
 YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQKGSYSLGIFGGKAQEVAGS
 AEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 9 - 741 de la cepa 5/99

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVALQIEKIN
 NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

5 **SEQ ID 10 - 741 de la cepa 67/00**

MTRSKPVNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
 DPEHSGKMKVAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLK
 SPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID 11 - 741 de la cepa 8Z169

LQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYK
 QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTITI
 DFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEV
 KTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 12 - 741 de la cepa 72/00

LQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYK
 QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTITI
 DFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEV
 KTVNGIRHIGLAAKQ

10

SEQ ID 13 - 741 de la cepa 931114

MTRSKPVNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
 DPEHSGKMKVAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLK
 SPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID 14 - 741 de la cepa 95N477

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVALQIEKIN
 NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

15 **SEQ ID 15 - 741 de la cepa 96217**

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVALQIEKIN
 NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
 PEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 16 - 741 de la cepa 8Z133

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
 DSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLK
 SPELNVDLAASDIKPKKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 17 - 741 de la cepa 8Z232

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

5 **SEQ ID 18 - 741 de la cepa C11**

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 19 - 741 de la cepa M1090

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
 PEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

10 **SEQ ID 20 - 741 de la cepa M1096**

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 21 - 741 de la cepa M198/172

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
 DSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLK
 SPELNVDLAASDIKPKKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 21- 741 de la cepa NGH38

15 MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 23 - NMBI343 de diez cepas de meningococos

MGNFLYRGI SCQQDEQNNGQLKPKGNAEVAIRYDGKFKYDGKATHGPSVKNVYAHQIETGLYDGCYIS
 TTTDKIEIAKKFATSSGIENGYIYVLRDLFGQYSIFEYEVHPENPNEKEVTIRAEDCGCIPPEVI IAKE
 LIEIN

SEQ ID 24 - NMBI343 de gonococcus

INNLWEISYLYRGI SCQQDEQNNQGLKPKGNKAEVAIRYDGFYDYGKATHGPSVKNVYAHQIETDLYD
 GYIISTTTDKEIAKKFATSSGIENGYIYVLNRDLFGQYSIFEYEVHPENPDEKEVTIRAEDCGCIPEEV
 IIAKELIEIN

SEQ ID 25 - secuencia de ácido nucleico NMB1343 (gonococcus)

TCCGCCGCATTACCTTATAAAAATAAAACATCCCTCTCAAGCAGTCTGATAATGTTTGGATTGCTTGAGAT
 TGATGAGTGATGGTGTAAATTCAACTTTAAATTAATAACTTATGGGAAATTTCTTATTTATATAGAGG
 CATTAGTTGCCAACAAGATGAGCAAAATAATGGACAGTTAAAACCTAAAGGTAATAAAGCTGAAGTTGCA
 ATTCGTTATGATGGTAAGTTTAAATATGATGGTAAAGCTACACATGGTCCAAGTGTGAAGAATGCAGTTT
 ACGCCCATCAAATTGAAACAGATCTATATGACGGATGTTATATATCTACGACAACAGACAAGGAAATTC
 CAAGAAATTTGCAACAAGCTCCGGCATCGAAAATGGCTATATATATGTTTTAAATAGAGATTTGTTTGGT
 CAATATTTCTATTTTTGAATATGAGGTTGAACATCCAGAAAACCCAGATGAGAAGGAAGTAACAATCAGAG
 CTGAAGATTGTGGCTGTATTCCTGAAGAAGTGATTATTGCTAAAGAGTTGATAGAAATTAACATAAGTTGA
 AAGGTC AATATAATGGCTTTAGTTGAATTGAAAGTGCCCCGACATTGGCGGACACGAAAATGTAGATATTA
 TCGC

SEQ ID 26 - secuencia de ácido nucleico NMB1343 (meningococcus)

TCCGCCGCATTACCTTATAAAAATAAAACATCCCTCTCAAGCAGTCTGATAATGTTTGGATTGCTTGAGAT
 TGATGAGTAATGGTGTAAATTCAACTTTAAATTAATAACTTATGGGAAATTTCTTATATAGAGGCATT
 AGTTGCCAACAAGATGAGCAAAATAATGGACAGTTAAAACCTAAAGGTAATAAAGCTGAAGTTGCAATTC
 GTTATGATGGTAAGTTTAAATATGATGGTAAAGCTACACATGGTCCAAGTGTGAAGAATGCAGTTTACGC
 CCATCAAATTGAAACAGGTCTATATGACGGATGTTATATATCTACGACAACAGACAAGGAAATTCGCAAG
 AAATTTGCAACAAGTTCCGGCATCGAAAATGGCTATATATATGTTTTAAATAGGGATTTGTTTGGTCAAT
 ATTTCTATTTTTGAATATGAGGTTGAACATCCAGAAAACCCAAATGAGAAGGAAGTAACAATCAGAGCTGA
 AGATTGTGGCTGTATTCCTGAAGAAGTGATTATTGCTAAAGAGTTGATAGAAATTAACATAAGTTGAAAGG
 TCAATATAATGGCTTTAGTTGAATTGAAAGTGCCCCGACATTGGCGGACACGAAAATGTAGATATTATCGC

5

SEQ ID 27 - engarce

GSGGGG

SEQ ID 28 - híbrido ΔG287-953 preferido

MASPDVKSADTLSKPAAPVVAEKETEVEKEDAPQAGSQGQAPSTQGSQDMAAVSAENTGNGGAATTDKPK
 NEDEGPQNDMPQNSAESANQGTGNNQPADSSDSAPASNPAANGGNSFRVLDLANGVLIDGPSQNI¹LT²HC
 KGDSCNGDNL³LDEEAPSKSEFENLNESERIEKYKDKGKSDKFTNLVAVQANGTNKYVI⁴IYKDKSASSS
 SARFRRSARSRSLPAEMPLI⁵PVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALR
 VQGEPAKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAAKVDFGSKSV⁶DGI⁷IDS⁸GDDLHMG⁹TQK¹⁰F¹¹KA¹²I
 DNG¹³FG¹⁴K¹⁵TW¹⁶TENGGD¹⁷VSG¹⁸RFY¹⁹GPAGEEVAGKY²⁰SYRPTDAEKGGF²¹GVFAGKKEQ²²DG²³SGGG²⁴GATY²⁵KV²⁶DEY²⁷H
 ANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHF²⁸TDHLKSADIFDAAQY²⁹PD
 IRFVSTKFNFN³⁰GK³¹KLVSVDGNLTMHGKTAPVKLKA³²EKF³³NCY³⁴QSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTK³⁵W³⁶VDY³⁷LV
 NVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

10

SEQ ID 29 - híbrido ΔG287_{Nz}-953

MASPDVKSADTLSKPAAPV¹VSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSAQGGQDMAAVSEENTGNGGAAATTDKPK
 NEDEGAQNDMPQNAADTDSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESEQPANQPD²MANTADGMQGGDDPSAGG
 ENAGNTAAQGTNQAENNQTAGSQNPASSTNPSATNSGGDFGR³TNVGNSVVIDGPSQNI⁴LT⁵HC⁶KGDSCSG
 NNFLDEEVQLKSEFEKLS⁷DADKI⁸SNYKDKGKNDGKNDK⁹FVGLVADSVQMKGINQYI¹⁰IFYKPKPTSFARFR
 RSARSRSLPAEMPLI¹¹PVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGE¹²P
 SKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPS¹³PSRGRFAAKVDFGSKSV¹⁴DGI¹⁵IDS¹⁶GDLHMG¹⁷TQK¹⁸F¹⁹KA²⁰IDNGF
 KGTW²¹TENGGD²²VSG²³KFY²⁴GPAGEEVAGKY²⁵SYRPTDAEKGGF²⁶GVFAGKKEQ²⁷DG²⁸SGGG²⁹GATY³⁰KV³¹DEY³²HANARF
 AIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHF³³TDHLKSADIFDAAQY³⁴PD³⁵IRFVS
 TKFNFN³⁶GK³⁷KLVSVDGNLTMHGKTAPVKLKA³⁸EKF³⁹NCY⁴⁰QSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTK⁴¹W⁴²VDY⁴³LVN⁴⁴VG⁴⁵MT
 KSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID 30 - híbrido 936-ΔG741

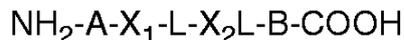
MKPKPHTVRTLIAAIFSLALSGCVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQRNNQ
TKGYTPQISVVGYNRHLLELLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSK
VRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGGVA
ADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKLAQQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDI
RQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLP EGGR
ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEK
GSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 31- 967c

MATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTN
LTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNI
KIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAE
AAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRL
ASAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

REIVINDICACIONES

1. Una proteína híbrida que tiene la fórmula:



5 en la que cada L es una secuencia de aminoácidos de engarce opcional, A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional, B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional

(i) X₁ es

(a) la secuencia de aminoácidos de *N. meningitidis* 936 (SEQ ID 2884 del documento WO99/57280)

10

```

1  MKPKPHTVRT LIAAIFSLAL SGCVSAVIGS AAVGAKSAVD RRTTGAQTDD
51  NVMALRIETT ARSYLRQNNQ TKGYTPQISV VGYNRHLLLL GQVATEGEKQ
101 FVGQIARSEQ AAEQVYNYIT VASLPRTAGD IAGDTWNTSK VRATLLGISP
151 ATQARVKIVT YGNVTYVMGI LTPEEQAQIT QKVSTTVGVQ KVITLYQNYV
201 QR, o

```

(b) una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de (a); y

(ii) X₂ es

15 (a) la secuencia de aminoácidos de *N.meningitidis* 741 (SEQ ID 2536 del documento WO99/57280)

```

1  VNRTAFCCLS LTTALILTAC SSGGGGVAAD IGAGLADALT APLDHKDKGL
51  QSLTLDQSVR KNEKLKLAQA GAEKTYGNGD SLNTGKLNKND KVSFRDFIRQ
101 IEVDGQLITL ESGEFQVYKQ SHSALTAFTQ EQIQDSEHSG KMKVAKRQFRI
151 GDIAGEHTSF DKLPEGGRAT YRGTAFGSDD AGGKLTYTID FAAKQNGKI
201 EHLKSPELNV DLAAADIKPD GKRHAVISGS VLYNQAEEKGS YSLGIFGGKA
251 QEVAGSAEVK TVNGIRHIGL AAKQ,

```

(b) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de (a) con una supresión N-terminal hasta e incluyendo el resto 26; o

20 (c) una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de (a) o (b).

2. La proteína híbrida de la reivindicación 1, en la que X₁ es 936 de la cepa 2996, y

(a) tiene la secuencia

1 MKPKPHTVRT LIAAIFSLAL SGCVSAVIGS AAVGAKSAVD RRTTGAQTDD
51 NVMALRIETT ARSYLRQNNQ TKGYPQISV VGYDRHLLLL GQVATEGEKQ
101 FVGQIARSEQ AAEGVYNYIT VASLPRTAGD IAGDTWNTSK VRATLLGISP
251 ATRARVKIVT YGNVTYVMGI LTPEEQAQIT QKVSTTVGVQ KVITLYQNYV
251 QR; o

(b) una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de (a).

3. La proteína híbrida de la reivindicación 1, en la que X_2

5 (a) tiene una secuencia seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID números 1 - 22 en el presente documento; o

(b) una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de (a).

10 **4.** La proteína híbrida of una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en la que L tiene 20 o menos aminoácidos.

5. La proteína híbrida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que L es un engarce de poliglicina.

6. La proteína híbrida of una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en la que L tiene la secuencia de aminoácidos GSGGGG.

15 **7.** La proteína híbrida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en la que A tiene 40 o menos aminoácidos.

8. La proteína híbrida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en la que B tiene 40 o menos aminoácidos.

9. La proteína híbrida de la reivindicación 1, que tiene la secuencia relatada en la SEQ ID 30.

20 **10.** Ácido nucleico que codifica la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9.

11. Una composición que comprende la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y una o más de las siguientes proteínas:

(1) proteína de Neisseria 287

(2) proteína de Neisseria 741

25 (3) proteína de Neisseria ORF46.1

(4) proteína de Neisseria 961

(5) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que $n = 2$, $X_1 =$ proteína de Neisseria 287, $X_2 =$ proteína de Neisseria 953 (6) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que $n = 2$, $X_1 =$ proteína de Neisseria 287, $X_2 =$ proteína de Neisseria 919

30 (7) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que $n = 2$, $X_1 =$ proteína de Neisseria 287, $X_2 =$ proteína de Neisseria 961

(8) $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que $n = 2$, $X_1 =$ proteína de *Neisseria* 287, $X_2 =$ proteína de *Neisseria* 741.

12. La composición de la reivindicación 11, que comprende las proteínas (4) y (5).

13. La composición de la reivindicación 12, en la que proteína (4) comprende la SEQ ID 31 y la proteína (5) comprende la SEQ ID 28 o la SEQ ID 29.

14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende además:

- una proteína antígeno de *N. meningitidis*;

- una preparación de vesículas de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis*;

- un antígeno de sacárido de *N. meningitidis*;

- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae*;

- un antígeno de virus de hepatitis A, B o C;

- un antígeno de *Bordetella pertussis*;

- un antígeno de difteria;

- un antígeno de tétanos;

- un antígeno de proteína de *Helicobacter pylori*;

- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae*;

- un antígeno de *N. gonorrhoeae*;

- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae*;

- un antígeno de *Chlamydia trachomatis*;

- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis*;

- antígeno (s) de polio;

- antígeno (s) de rabia;

- antígenos de sarampión, paperas y / o rubéola;

- antígeno (s) de influenza;

- un antígeno de *Moraxella catarrhalis*;

- un antígeno de *Streptococcus agalactiae*;

- un antígeno de *Streptococcus pyogenes*; y / o

- un antígeno de *Staphylococcus aureus*.

15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. La composición de la reivindicación 15 para uso como un medicamento.

17. Uso de una composición de la reivindicación 15 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad provocada por *Neisseria*.

18. La composición de la reivindicación 15 para uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por *Neisseria*.

19. El uso de acuerdo con la reivindicación 17 o la composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que dicha enfermedad es meningitis bacteriana.

FIGURA 1

	1020304050	
312294	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
96	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
96217	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
M1090	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
95N477	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
C11	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
599	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
24	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 11
1000	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
M1096	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
BZ232	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
NGH38	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
25	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 18
6700	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
93114	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
21	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 44
3999	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 48
3000	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 49
7	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 45
7200	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 45
M198172	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
BZ133	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
220173I	1:	MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGIADALTAAPL	: 50
	60708090100	
312294	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
96	1:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 49
96217	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
M1090	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
95N477	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
C11	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
599	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
24	12:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 61
1000	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
M1096	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
BZ232	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
NGH38	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
25	19:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 68
6700	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
93114	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
21	45:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 94
3999	1:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 48
3000	1:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 49
7	1:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 45
7200	1:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 45
M198172	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
BZ133	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100
220173I	51:	HKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR	: 100

FIGURA 1 continuación

		110	120	130	140	150																																								
312294	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	I	Y	K	D	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
96	50:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	I	Y	K	D	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	99	
96217	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	I	Y	K	D	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
M1090	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	I	Y	K	D	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
95N477	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	I	Y	K	D	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
C11	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	I	Y	K	D	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
599	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	I	Y	K	D	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
24	62:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	I	Y	K	D	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	111	
1000	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	T	I	T	L	A	S	G	E	F	Q	I	Y	K	N	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
M1096	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	T	I	T	L	A	S	G	E	F	Q	I	Y	K	N	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
BZ232	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	T	I	T	L	A	S	G	E	F	Q	I	Y	K	N	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
NGH38	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	T	I	T	L	A	S	G	E	F	Q	I	Y	K	N	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	150	
25	69:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	T	I	T	L	A	S	G	E	F	Q	I	Y	K	N	H	S	A	V	V	A	L	Q	I	E	K	N	N	D	K	I	D	S	L	I	N	:	118	
6700	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	L	Q	T	E	Q	E	Q	D	E	H	S	G	K	M	V	A	:	150
93114	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	L	Q	T	E	Q	E	Q	D	E	H	S	G	K	M	V	A	:	150
21	95:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	F	Q	T	E	Q	D	S	E	H	S	G	K	M	V	A	:	144	
3999	49:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	F	Q	T	E	Q	D	S	E	H	S	G	K	M	V	A	:	98	
3000	50:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	F	Q	T	E	Q	D	S	E	H	S	G	K	M	V	A	:	99	
7	46:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	F	Q	T	E	Q	D	S	E	H	S	G	K	M	V	A	:	95	
7200	46:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	F	Q	T	E	Q	D	S	E	H	S	G	K	M	V	A	:	95	
M198172	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	F	Q	T	E	Q	D	S	E	H	S	G	K	M	V	A	:	150	
BZ133	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	L	Q	T	E	Q	D	S	E	H	S	G	K	M	V	A	:	150	
220173I	101:	FD	FIR	QIE	V	D	G	Q	L	I	T	L	E	S	G	E	F	Q	V	Y	K	S	H	S	A	L	T	A	F	Q	T	E	Q	D	S	E	H	S	G	K	M	V	A	:	150	

		160	170	180	190	200																																															
312294	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	199	
96	100:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	148	
96217	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	199	
M1090	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	199	
95N477	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	199	
C11	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	199	
599	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	199	
24	112:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	160	
1000	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	199	
M1096	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	199	
BZ232	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	199	
NGH38	151:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	199	
25	119:	Q	R	S	F	L	V	S	G	L	G	G	E	H	T	A	F	N	Q	L	P	S	G	K	A	E	Y	H	G	K	A	F	S	S	D	D	P	N	G	R	L	H	Y	S	I	D	F	T	K	K	:	167	
6700	151:	K	R	R	F	K	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	K	D	V	M	A	T	Y	R	G	T	A	F	G	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	200
93114	151:	K	R	R	F	K	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	K	D	V	M	A	T	Y	R	G	T	A	F	G	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	200
21	145:	K	R	Q	F	R	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	G	G	R	A	T	Y	R	G	T	A	F	G	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	194	
3999	99:	K	R	Q	F	R	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	G	G	R	A	T	Y	R	G	T	A	F	G	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	148	
3000	100:	K	R	Q	F	R	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	G	G	R	A	T	Y	R	G	T	A	F	G	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	149	
7	96:	K	R	Q	F	R	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	G	G	R	A	T	Y	R	G	T	A	F	G	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	145	
7200	96:	K	R	Q	F	R	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	G	G	R	A	T	Y	R	G	T	A	F	G	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	145	
M198172	151:	K	R	Q	F	R	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	G	G	R	A	T	Y	R	G	T	A	F	G	S	D	D	A	G	G	K	L	T	Y	T	I	D	F	A	A	K	:	200	
BZ133	151:	K	R	Q	F	R	I	G	D	I	A	G	E	H	T	S	E	D	K	L	P	G																															

FIGURA 1 continuación

		210	220	230	240	250	
312294	200:	QGHGKIEHLKTPEQ	NVELAA	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
96	149:	QGHGKIEHLKTPEQ	NVELAA	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:198
96217	200:	QGHGKIEHLKTPEQ	NVELAA	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
M1090	200:	QGHGKIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
95N477	200:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
C11	200:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
599	200:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
24	161:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:210
1000	200:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
M1096	200:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
BZ232	200:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
NGH38	200:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:249
25	168:	QGYGRIEHLKTPEQ	NVELAS	ELKADEKSHAVIL	GDTRYGSE	EKGTYHLA	:217
6700	201:	QGHGKIEHLKSP	NVELAT	YIKPDEKHHAVIS	GSVLYNQ	DEKGSYSLG	:250
93114	201:	QGHGKIEHLKSP	NVELAT	YIKPDEKHHAVIS	GSVLYNQ	DEKGSYSLG	:250
21	195:	QGNKIEHLKSP	NVDLAA	DIRPDGKRHAVIS	GSVLYNQ	AEKGSYSLG	:244
3999	149:	QGNKIEHLKSP	NVDLAA	DIRPDGKRHAVIS	GSVLYNQ	AEKGSYSLG	:198
3000	150:	QGNKIEHLKSP	NVDLAA	DIRPDGKRHAVIS	GSVLYNQ	AEKGSYSLG	:199
7	146:	QGNKIEHLKSP	NVDLAA	DIRPDGKRHAVIS	GSVLYNQ	AEKGSYSLG	:195
7200	146:	QGNKIEHLKSP	NVDLAA	DIRPDGKRHAVIS	GSVLYNQ	AEKGSYSLG	:195
M198172	201:	QGHGKIEHLKSP	NVDLAA	SDIRPDGKRHAVIS	GSVLYNQ	AEKGSYSLG	:250
BZ133	201:	QGHGKIEHLKSP	NVDLAA	SDIRPDGKRHAVIS	GSVLYNQ	AEKGSYSLG	:250
220173I	201:	QGNKIEHLKSP	NVDLAA	DIRPDGKRHAVIS	GSVLYNQ	AEKGSYSLG	:250

		260	270	280	
312294	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
96	199:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:212
96217	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
M1090	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
95N477	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
C11	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
599	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
24	211:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:234
1000	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
M1096	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
BZ232	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
NGH38	250:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:279
25	218:	LFGDRAQELTAGS	ATVIREKVE	ETITAGKQ	:247
6700	251:	IFGGQAQEVAGS	AETANGIRH	LAAKQ	:280
93114	251:	IFGGQAQEVAGS	AETANGIRH	LAAKQ	:280
21	245:	IFGGKAQEVAGS	AETVNGIRH	LAAKQ	:274
3999	199:	IFGGKAQEVAGS	AETVNGIRH	LAAKQ	:228
3000	200:	IFGGKAQEVAGS	AETVNGIRH	LAAKQ	:229
7	196:	IFGGKAQEVAGS	AETVNGIRH	LAAKQ	:225
7200	196:	IFGGKAQEVAGS	AETVNGIRH	LAAKQ	:225
M198172	251:	IFGGQAQEVAGS	AETANGIRH	LAAKQ	:280
BZ133	251:	IFGGQAQEVAGS	AETANGIRH	LAAKQ	:280
220173I	251:	IFGGKAQEVAGS	AETVNGIRH	LAAKQ	:256

FIGURA 2

936-741_{MC58}-His

936-741_{ET37}-His