

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 937**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06831853 .4**
96 Fecha de presentación: **27.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1976990**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2008**

54 Título: **POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS , HIBRIDOS Y EN TANDEM DE NMB1870 MENINGOCOCICO.**

30 Prioridad:
25.11.2005 GB 0524066

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2011

73 Titular/es:
**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT**

72 Inventor/es:
**MASIGNANI, Vega;
SCARSELLI, Maria;
RAPPUOLI, Rino;
PIZZA, Mariagrazia y
GIULIANI, Marzia**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

ES 2 369 937 T3

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos quiméricos, híbridos y en tándem de NMB1870 meningocócico.

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se encuentra en el campo de la inmunización y, en particular, de la inmunización contra enfermedades causadas por bacterias patogénicas del género *Neisseria*, tales como *N. meningitidis* (meningococo).

Técnica anterior

- 10 *Neisseria meningitidis* es una bacteria gramnegativa encapsulada que coloniza el tracto respiratorio alto de aproximadamente 10 % de la población humana. Aunque se dispone de las vacunas de polisacáridos y conjugados contra los serogrupos A, C, W135 e Y, este enfoque no se puede aplicar al serogrupo B porque el polisacárido capsular es un polímero de ácido polisialílico que es un autoantígeno en seres humanos. Para desarrollar una vacuna contra el serogrupo B se han usado proteínas expuestas contenidas en las vesículas de la membrana externa (VMO). Estas vacunas producen respuestas de anticuerpos bactericidas en suero y protegen contra la enfermedad, pero no inducen protección cruzada entre cepas [1]. Por tanto, algunos trabajadores se han centrado en antígenos meningocócicos específicos para uso en vacunas [2].

- 15 Uno de estos antígenos es "NMB1870". Esta proteína se denominó inicialmente proteína "741" de la cepa MC58 [SEC ID N° 2535 y 2536 en la ref. 3; SEC ID 1 en el presente documento] y también se ha denominado 'GNA1870' [refs. 4-6, tras la ref. 2] y 'ORF2086' [7-9]. Esta lipoproteína se expresa en todos los serogrupos de meningococos y se ha encontrado en múltiples cepas de meningococos. Las secuencias de NMB1870 se han agrupado en tres familias (denominadas en el presente documento familias I, II y III) y se ha encontrado que el suero producido contra una familia dada es bactericida dentro de la misma familia, pero no es activo contra cepas que expresan una de las otras dos familias, es decir existe una protección cruzada dentro de la familia pero no hay una protección cruzada entre familias.

- 25 Por tanto, para conseguir protección cruzada entre cepas usando NMB1870 se usa más de una familia. Para evitar la necesidad de expresar y purificar proteínas separadas se ha propuesto expresar diferentes familias como proteínas híbridas [10-12], incluidas dos o tres de las familias en una única cadena polipeptídica. Se han analizado varios híbridos y han proporcionado una alentadora eficacia anti-meningocócica.

Es un objeto de la invención proporcionar más y mejores enfoques para superar la especificidad de la familia de la protección proporcionada por NMB1870 y para usar estos enfoques para conferir inmunidad contra la enfermedad y/o infección meningocócicas, en particular para el serogrupo B.

30 **Divulgación de la invención**

- Como complemento del trabajo descrito en la referencia 13, los inventores han sustituido las secuencias de una familia NMB1870 en la correspondiente posición en otra familia, con la ayuda de producir un NMB 1870 quimérico que no tiene la especificidad de familia de los polipéptidos silvestres. Mientras que cada familia de NMB1870 individual puede producir anticuerpos (p. ej., en ratones) que son eficaces únicamente contra cepas de la misma familia de NMB1870, los polipéptidos quiméricos de la invención pueden producir anticuerpos que reconocen polipéptidos NMB1870 de más de una familia.

Sustituciones en la familia NMB1870

- 40 La referencia 13 divulga la sustitución de secuencias de una familia de NMB1870 a otro marco de NMB1870, para dar polipéptidos quiméricos de NMB1870. Los inventores han realizado trabajos adicionales con las quimeras y han identificado una serie de residuos clave para la sustitución en la secuencia de NMB1870 de la familia I. La sustitución de estos residuos puede mejorar la capacidad del polipéptido para producir anticuerpos que reaccionen de forma cruzada con los polipéptidos de la familia II.

- 45 Por tanto, la invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70 % con la SEC ID N° 57 y en la que uno o más de los residuos siguientes está sustituido con otro aminoácido: I39; K48; E51; R54; T56; A67; K70; A78; A79; K85; D97; P105; S114; S116; L118; N120; Q121; A122; T147; N149.

Se prefiere que al menos uno de los residuos siguientes esté sustituido: I39; T56; K70; A78; A79; K85; D97; S114; S116; L118. Ninguno de estos residuos se seleccionó para la sustitución en la referencia 13.

- 50 Los aminoácidos preferidos para la sustitución son: K48; E51; R54; A79; K85; P105; L118; N120; Q121; A122; T147; N149.

Preferentemente, los residuos están sustituidos con el correspondiente aminoácido de NMB 1870 en la familia II o la familia III. Por tanto, las sustituciones preferidas son: I39L; K48Q; R54K; T56E; K70R; A78T; A79K; K85R; D97E; P105A; S114L; S116D; L118R; N120G; Q121S; A122E; T147I; N149E; todos estos tienen el mismo aminoácido en dos de las familias I, II y III. La secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 85 % con la SEC ID N° 57, por ejemplo $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ o superior. Esta secuencia puede estar presente como parte de un polipéptido más grande.

El polipéptido tiene la capacidad de inducir anticuerpos bactericidas anti-meningocócicos tras la administración a un huésped animal y puede inducir anticuerpos que son bactericidas contra cepas de cada una de las tres familias de NMB1870 I a III. A continuación se proporciona información adicional sobre respuestas bactericidas.

10 **Polipéptidos híbridos y en tándem**

Las referencias 10 a 13 divulgan polipéptidos híbridos en los que una única cadena polipeptídica incluye una secuencia de NMB1870 y una secuencia de polipéptido meningocócico diferente. Por ejemplo, los híbridos que contienen NMB1870 y NadA se divulgan en la referencia 10. La referencia 12 divulga una subpoblación específica de polipéptidos híbridos, denominados polipéptidos en tándem, en los que una cadena polipeptídica sencilla incluye múltiples secuencias de NMB1870, por ejemplo uno de cada familia.

En general, un polipéptido híbrido se puede representar con la fórmula:

$-A-[-X-L-]_n-B$

en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de Neisseria, L es una secuencia de aminoácidos ligadora opcional; A es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo N; B es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo C y n es un número entero superior a 1.

El valor de n puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más, pero, preferentemente, es 2 o 3. La secuencia -A- está, preferentemente, en el extremo N del polipéptido y la secuencia -B- está, preferentemente, en el extremo C del polipéptido.

Al menos uno de los restos -X- es una secuencia de NMB1870 de la invención.

Para n casos de $[-X-L-]$, la secuencia de aminoácidos ligadora -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n = 2$, el híbrido puede ser $NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH$, etc. La(s) secuencia(s) de aminoácidos ligadora(s) -L- normalmente serán cortas (*p. ej.*, de 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). Ejemplos incluyen secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, ligadores de poli-glicina (es decir, Gly_n , donde $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más) y marcas de histidina (es decir, His_n , donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos adecuadas en el extremo C serán evidentes para los expertos en la técnica. Un ligador útil es GSGGGG (SEC ID N° 15), estando el dipéptido Gly-Ser formado a partir de un sitio de restricción *Bam*HI, de modo que ayuda a la clonación y manipulación, y el tetrapéptido Gly_4 (SEC ID N° 16) es otro ligador de poli-glicina típico. Otro ligador útil es la SEC ID N° 17, que opcionalmente puede estar precedida por un dipéptido Gly-Ser (SEC ID N° 18, de *Bam*HI) o un dipéptido Gly-Lys (SEC ID N° 19, de *Hind*III).

-A- es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo N. Esta normalmente será corta (*p. ej.*, de 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, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (*p. ej.*, marcas de histidina, es decir His_n , donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos en el extremo N adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Si X_1 carece de su propia metionina en el extremo N, -A- puede proporcionar dicho residuo de metionina en el polipéptido traducido (*p. ej.*, -A- es un solo residuo de Met). La Met puede estar en el extremo N de una secuencia ligadora, tal como la SEC ID N° 17 (es decir SEC ID 21) o en el extremo N de una secuencia corta (*p. ej.*, la SEC ID N° 26). Ejemplos de secuencias de -A- incluyen las SEC ID N° 21, 26 y 43.

-B- es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo C. Esta normalmente será corta (*p. ej.*, de 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, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (*p. ej.*, que comprenden marcas de histidina, es decir His_n , donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más, *p. ej.*, la SEC ID N° 20) o las secuencias que potencian estabilidad al polipéptido. Otras secuencias de aminoácidos adecuadas en el extremo C serán evidentes para los expertos en la técnica. Un resto -B- adecuado es la SEC ID N° 41, en la que el dipéptido Leu-Glu (SEC ID N° 44), en 5' de la SEC ID N° 20 se produce a partir de un sitio de restricción *Xho*I.

En polipéptidos híbridos preferidos de la invención, uno de los restos X es una secuencia de la "proteína 936". La

proteína 936 se divulgó inicialmente como la SEC ID N° 2884 en la referencia 3 (SEC ID N° 14 en el presente documento y una versión señal truncada de esta secuencia es la SEC ID N° 25 en el presente documento. Las secuencias "936" para usar con la invención incluyen las secuencias (i) que tienen una identidad de secuencia al menos z% con la SEC ID N° 25 y/o (ii) que comprende un fragmento de al menos f aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 25. El valor de z se selecciona de 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 o más. El valor off se selecciona de 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 75, 100, 150, 200 o más.

Algunos polipéptidos híbridos preferidos incluyen una secuencia de 936 y dos secuencia de NMB1870. El 936 es, preferentemente, el extremo más N de estas tres secuencias.

- 10 Por ejemplo, cuando $n = 2$, X_1 puede ser una secuencia de "936" y X_2 puede ser una secuencia de NMB1870.

Familias de NMB1810

- Las secuencias de NMB1870 entran dentro de tres familias [4,10] que en el presente documento se denominan familias I, II y III. Las secuencias prototípicas para las familias I-III son, respectivamente, las SEC ID N° 1-3. Se pueden seguir los procedimientos filogenéticos y dendrograma de la referencia 4 con el fin de determinar fácilmente la familia para una secuencia de NMB1870 dada y una alineación pareada con cada una de las tres secuencias de NMB1870 prototípicas también se pueden usar para encontrar la coincidencia de familia más cercana. Las secuencias entran claramente en las tres familias, Siendo la identidad de secuencia del 74,1 % entre las familias I y II, el 62,8 % entre las familias I y III y el 84,7% entre las familias II y III, y siendo la variación de secuencia dentro de cada familia (p. ej., un mínimo de identidad de 91,6% en la familia I, 93,4 % en la familia II y de 93,2 % en la familia III). Un modo rápido de determinar la secuencia de una familia sin requerir un análisis filogenético se puede colocar una secuencia en la familia I si tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la SEC ID N° 1 se puede introducir en la familia II si tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la SEC ID N° 2 se puede introducir en la familia III si tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la SEC ID N° 3.

Polipéptidos

- 25 NMB1870 es una lipoproteína natural de *N. meningitidis*. También se ha descubierto que está lipídada cuando se expresa en *E.coli*. Los polipéptidos de la invención pueden tener un residuo de cisteína en el extremo C, que puede estar lipídado, que comprenden, por ejemplo, un grupo palmitófilo.

Una característica de los polipéptidos de la invención es la capacidad para inducir anticuerpos bactericidas anti-meningocócicos tras la administración a un animal huésped.

- 30 Los polipéptidos de la invención se pueden preparar por varios medios, por ejemplo mediante síntesis química (al menos en parte) mediante digestión de los polipéptidos más largos usando proteasas, mediante traducción desde ARN, mediante purificación del cultivo celular (p. ej., de la expresión recombinante o del cultivo de *N. meningitidis*) etc. La expresión heteróloga de un huésped de *E. coli* es una vía de expresión preferida (p. ej., en DH5 α , BL21(DE3), BLR, etc.).

- 35 Los polipéptidos de la invención pueden estar fijados o inmovilizados en un soporte sólido.

Los polipéptidos de la invención pueden comprender un marcador detectable, por ejemplo un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o un marcador de biotina. Esto es particularmente útil en técnicas de inmunoensayo.

Los polipéptidos pueden tomar varias formas (p. ej., nativas, fusiones, glicosiladas, no glicosiladas, lipídadas, puentes disulfuro etc.).

- 40 Preferentemente, los polipéptidos se preparan en forma sustancialmente pura o sustancialmente aislada (*es decir*, sustancialmente libre de otros polipéptidos de *Neisseria* o de células huésped.). En general, los polipéptidos se proporcionan en un ambiente no natural, por ejemplo se separan de su ambiente natural. En ciertas realizaciones, el polipéptido objeto está presente en una composición que está enriquecida para el polipéptido en comparación con un control. Como tal, se proporciona el polipéptido purificado, con purificado se quiere decir que el polipéptido está presente en una composición que está sustancialmente libre de otros polipéptidos expresados, de modo que con sustancialmente libre se quiere decir que menos del 90 %, normalmente menos del 60 % y, más normalmente, menos del 50 % de la composición está hecho de otros polipéptidos expresados.

- 50 El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También incluidos

dentro de la definición están, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos se pueden producir en forma de cadenas sencillas o cadenas asociadas.

Ácidos nucleicos

- 5 La invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención como se ha definido anteriormente.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar en reacciones de hibridación (p. ej., transferencias de tipo northern o southern, o en micromatrices de ácido nucleico o "chip génicos") y en reacciones de amplificación (p. ej., PCR, SDA, SSSR, LCR, TMA, NASBA, etc.) y en otras técnicas de ácido nucleico.

- 10 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar de muchos modos mediante, por ejemplo, síntesis química (p. ej., síntesis con fosforamidita de ADN) en todo o en parte, digiriendo los ácidos nucleicos más largos usando nucleasas (p. ej., enzimas de restricción), uniendo los ácidos nucleicos más cortos o los nucleótidos (p. ej., usando ligasas o polimerasas), a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc etc.

- 15 Los ácidos nucleicos de la invención pueden tomar varias formas, por ejemplo monocatenarios, bicatenarios, vectores, cebadores, sondas, marcados, no marcados etc.

Los ácidos nucleicos de la invención están, preferentemente, en forma aislada o sustancialmente aislada.

La invención incluye ácido nucleico que comprende secuencias complementarias a las descritas anteriormente, por ejemplo para antisentido o sondaje, o para usar como cebadores.

- 20 El término "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen armazones modificados, y también ácidos nucleicos peptídicos (PNA) etc.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención se puede marcar con, por ejemplo, un marcador radioactivo o fluorescente. Esto es particularmente útil cuando el ácido nucleico se va a usar en las técnicas de detección de ácido nucleico, por ejemplo cuando el ácido nucleico es un dejador o como sonda para usar en técnicas tales como PCR, LCR, TMA, NASBA, etc.

- 25 La invención también proporciona vectores que comprenden secuencias de nucleótidos de la invención (p. ej., vectores de clonación o expresión, tales como los adecuados para inmunización con ácido nucleico) y células huésped transformadas con dichos vectores.

Respuestas bactericidas

- 30 Los polipéptidos de la invención pueden producir respuestas de anticuerpos que son bactericidas contra meningococos. Las respuestas de anticuerpos bactericidas se miden de forma conveniente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [p. ej., véase la nota al final 14 de la referencia 2]. Los polipéptidos de la invención pueden producir, preferentemente, una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra al menos una cepa de *N. meningitidis* de cada uno de al menos dos de los siguientes tres grupos de cepas:

- 35 (I) MC58, gb185 (=M01-240185), m4030, m2197, m2937, iss1001, NZ394/98, 67/00, 93/114, bz198, m1390, nge28, lnp17592, 00-241341, f6124, 205900, m198/172, bz133, gb149 (=M01-240149), nm008, mm092, 30/00, 39/99, 72/00, 95330, bz169, bz83, cu385, h44/76, m1590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44/89, 14847.

(II) 961-5945, 2996, 96217, 312294, 11327, a22, gb013 (=M01-240013), e32, m1090, m4287, 860800, 599, 95N477, 90-18311, c11, m986, m2671, 1000, m1096, m3279, bz232, dk353, m3697, ngh38, L93/4286.

- 40 (III) M1239, 16889, gb355 (=M01-240355), m3369, m3813, ngp165.

Por ejemplo, un polipéptido quimérico puede producir una respuesta bactericida eficaz contra dos o más cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B MC58, 961-5945 y M1239.

- 45 Preferentemente, el polipéptido puede producir una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra al menos el 50 % de las cepas meningocócicas del serogrupo B clínicamente relevantes (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más). El polipéptido puede producir una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B y cepas de al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4) de los serogrupos A, C, W135 e Y. El polipéptido puede producir una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas de *N. gonococcus* y/o *N. cinerea*. El polipéptido puede producir una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas de al menos dos de las tres ramas principales del dendrograma mostrado en la Figura 5 de la referencia 4.

El polipéptido puede producir una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas de *N. meningitidis* en al menos 2 (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7) de los linajes hipervirulentos del serogrupo B y cepas de al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4) de los serogrupos A, C, W135 e Y. El polipéptido puede producir ET-37, ET-5, clúster A4, linaje 3, subgrupo I, subgrupo III, y subgrupo IV-1 [16,17]. Los polipéptidos pueden inducir adicionalmente respuestas de anticuerpos bactericidas contra uno o más linajes hiperinvasivos.

Los polipéptidos pueden producir una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas de *N. meningitidis* en al menos 2 (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7) de los siguientes tipos de secuencia multilocus: ST1, ST4, ST5, ST8, ST11, ST32 y ST41 [18]. El polipéptido puede también producir una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra las cepas ST44.

El polipéptido no tiene que inducir anticuerpos bactericidas contra todas y cada una de las cepas de meningococo del serogrupo B en los linajes especificados o MLST, en su lugar, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas del meningococo del serogrupo B en un linaje hipervirulento concreto o MLST, los anticuerpos inducidos por la composición son, preferentemente, bactericidas contra al menos el 50% (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos de cepas preferidos incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los países siguientes: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. Preferentemente, el suero tiene un título bactericida de al menos 1024 (p. ej., 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o mayor, preferentemente al menos 2^{14}), es decir, el suero puede matar al menos el 50% de las bacterias de ensayo de una cepa concreta cuando está diluida al 1:1024, como se describe en la nota final 14 de la referencia 2. Polipéptidos quiméricos preferidos pueden producir una respuesta de anticuerpos en ratones que permanezca bactericida incluso cuando el suero se ha diluido a 1:4096 o mayor..

20 **Inmunización**

Preferentemente, los polipéptidos de la invención se proporcionan como composiciones inmunogénicas y la invención proporciona una composición inmunogénica de la invención para uso como medicamento.

La invención es útil para producir una respuesta de anticuerpos en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una composición inmunogénica de la invención. Preferentemente, la respuesta de anticuerpos es protectora y/o respuesta de anticuerpos bactericidas.

La invención es útil para proteger a un mamífero contra una infección por *Neisseria* (p. ej., meningococos), que comprende administrar al mamífero una composición inmunogénica de la invención.

La invención proporciona polipéptidos quiméricos de la invención para uso como medicamentos (p. ej., como composiciones inmunogénicas o como vacunas) o como reactivos diagnósticos. También se proporciona el uso de ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una infección por *Neisseria* (p. ej., meningococos) en un mamífero.

Preferentemente, el mamífero es un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o, preferentemente, un niño. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es, preferentemente, un niño (p. ej., un niño pequeño o un lactante); cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es, preferentemente, un adulto. Una vacuna destinada a niños puede también administrarse a adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad etc.

Los usos y procedimiento son particularmente útiles para la prevención/tratamiento de enfermedades incluidas, entre otras, meningitis (particularmente meningitis bacteriana) y bacteriemia.

La eficacia del tratamiento terapéutico se puede analizar monitorizando la infección por *Neisseria* tras la administración de la composición de la invención. La eficacia del tratamiento profiláctico se puede analizar monitorizando las respuestas inmunitarias contra NMB1870 tras la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención se puede determinar mediante su administración a sujetos de ensayo (p. ej., modelos animales [19]) y, después, determinando los parámetros estándar, incluidos los anticuerpos bactericidas en suero (ABS) y los títulos de ELISA (GMT). Estas respuestas inmunitarias generalmente se determinarán alrededor de meses después de la administración de la composición y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un incremento de los ABS de al menos 4 u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, se puede realizar más de una determinación postadministración.

Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio para seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable se sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado superior a lo que en un huésped se considera seroconversión contra el antígeno son bien conocidos y dichos títulos son publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente, más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertido, más preferentemente más del 90%, todavía más preferentemente más del 93% y, más preferentemente, 96-100%.

En general, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir mediante inyección parenteral (p. ej. por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido) o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o el brazo. La inyección se puede realizar a través de una aguja (p. ej., una aguja hipodérmica) pero, como alternativa, se puede usar la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de aproximadamente 0,5 ml.

La invención se puede usar para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa.

La posología del tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. A un calendario de dosis primaria le puede seguir un calendario de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis iniciales (p. ej., entre 4-16 semanas) y entre la administración inicial y la de refuerzo se pueden determinar de forma rutinaria.

Generalmente, la composición inmunogénica de la invención incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable que puede ser cualquier sustancia que no induzca por sí sola la producción de anticuerpos perjudiciales para el paciente que recibe la composición y que se puede administrar sin toxicidad indebida. Vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. En dichos vehículos también puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tampón del pH y similares. En la referencia 20 se puede encontrar una exhaustiva discusión de dichos vehículos.

Las infecciones con *Neisseria* afectan a varias zonas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención se pueden preparar de varias maneras. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar en forma de inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La composición se puede preparar para administración tópica, por ejemplo en forma de un ungüento, crema o polvo. La composición se puede preparar para administración oral, por ejemplo en forma de un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para administración pulmonar, *por ejemplo* en forma de un inhalador, usando un polvo fino o un atomizador. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular, *por ejemplo* en forma de gotas.

Preferentemente, la composición es estéril. Preferentemente es apirógena. Preferentemente está tamponada a, por ejemplo, un pH de 6 y Ph de 8, generalmente a un pH de aproximadamente 7. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio se prefiere usar un tampón de histidina [21]. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de inmunógeno, así como de cualquier otro componente especificado, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se quiere decir que la administración de dicha cantidad a un individuo, bien en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía en función de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (p. ej., primate no humano, primate etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico encargado del tratamiento de la situación médica y otros factores relevantes. Cabe esperar que la cantidad entre dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina. La posología del tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis (p. ej., incluidas dosis de refuerzo). La composición puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

Los adyuvantes que se pueden usar en las composiciones de la invención incluyen, entre otros:

A. Composiciones que contienen mineral

Las composiciones que contienen mineral adecuadas para usar como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (p. ej., oxihidróxidos), fosfatos (p. ej., hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos etc. [p. ej., véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia 22] o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (p. ej., gel, cristalina, amorfo, etc.) y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también se pueden formular en forma de una partícula de una sal metálica [23].

Particularmente se prefieren fosfatos de aluminio, particularmente en las composiciones que incluyen un antígeno sacárido de *H. influenzae* y un adyuvante típico es hidroxifosfato aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . La adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio se puede usar, por ejemplo, entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis. Cuando hay más de un conjugado en

una composición, no todas los conjugados tienen que adsorberse.

B. Emulsiones en aceite

- Las composiciones en emulsión en aceite adecuadas para usar como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tal como MF59 [Capítulo 10 de la referencia 22; véase también la referencia 24] (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85, formulado en partículas de submicrones usando un microfluidizador). También se pueden usar adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA). Las emulsiones de aceite en agua son útiles con la invención.

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la referencia 22]

- Las formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos de esterol y glicósidos de triterpenoide que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. El QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones específicas purificadas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la referencia 25 se divulga un procedimiento de producción de QS21. Las formulaciones de saponina pueden también comprender un esterol, tal como colesterol [26].

- Las combinaciones de saponinas y colesterol se pueden usar para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia 22]. Normalmente, los ISCOM también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOM se puede usar cualquier saponina conocida. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen con mayor detalle en las referencias 26-28. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [29].
- Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en las referencias 30 & 31.

D. Virosomas y partículas similares a virus

- Los virosomas y partículas similares a virus (VLP) también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Generalmente estas estructuras contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. En general son no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse a partir de virus enteros. Estas proteínas virales adecuadas para usar en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), el virus de la hepatitis B (tal como proteínas del núcleo o de la cápside), el virus de la hepatitis E, el virus del sarampión, el virus Sindbis, rotavirus, el virus de la enfermedad pie-boca, retrovirus, virus de Norwalk, el virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como proteína p1 del retrotransposón Ty). Las VLP se tratan con mayor detalle en las referencias 32-37. Los virosomas se tratan con mayor detalle en, por ejemplo, la referencia 38.

E. Derivados de bacterias o microbianos

- Los adyuvantes adecuados para usar en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos del lipopolisacárido de enterobacterias (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de los mismos.

- Los derivados no tóxicos del LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-O-desacilado con 4, 5, o 6 cadenas aciladas. Una forma en "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-O-desacilado se divulga en la referencia 39. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para esterilizarse mediante filtración a través de una membrana de 0,22 μ m [39]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen similares al monofosforil lípido A, tal como derivados de aminoalquilglucosaminida fosfato, por ejemplo RC-529 [40,41].

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli*, tal como OM-174. El OM-174 se describe en, por ejemplo, las referencias 42 y 43.

- Oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para usar como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace de fosfato a una guanósina). También se ha demostrado que los ARN de doble cadena y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimuladores.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o de una cadena. Las referencias 44, 45 y 46 divulgan posibles sustituciones de análogos, *por ejemplo* sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto de adyuvante de los oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en las referencias 47-52.

- 5 La secuencia de CpG puede dirigirse a aTLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [53]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como CpG-A ODN, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como CpG-B ODN. CpG-A y CpG-B ODN se tratan en las referencias 54-56. Preferentemente, el CpG es un CpG-A ODN.

- 10 Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente se pueden unir dos secuencias oligonucleotídicas CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 53 & 57-59.

- 15 Toxinas bacterianas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de las mismas se pueden usar como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación de ADP destoxificadas tales como adyuvantes de mucosa se describe en la referencia 60 y como adyuvantes parenterales en la referencia 61. La toxina o toxoide está, preferentemente, en forma de holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferentemente la subunidad B no ha mutado. Preferentemente, el adyuvante es un mutante LT destoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se pueden encontrar en las ref. 62-69. Preferentemente, la referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas de ribosilación de ADP indicadas en la referencia 70, específicamente incorporadas en la presente memoria descriptiva en su totalidad por referencia.
- 20

F. Inmunomoduladores humanos

- 25 Los inmunomoduladores humanos adecuados para usar como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (*p. ej.*, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [71], *etc.*) [72], interferones (*p. ej.*, interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

- 30 Los bioadhesivos y mucoadhesivos también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico [73] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También se pueden usar como adyuvantes en la invención quitosano y derivados del mismo [74].

H. Micropartículas

- 35 Las micropartículas también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (*es decir*, una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 μ m de diámetro, y más preferentemente de ~500 nm a ~10 μ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (*p. ej.*, un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona *etc.*) con poli(láctido-co-glicólido), opcionalmente tratadas para tener una superficie con carga negativa (*p. ej.*, con SDS) o una superficie con carga positiva (*p. ej.*, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la referencia 22)

- 40 Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para usar como adyuvantes se describen en las referencias 75-77.

J. Formulaciones de polioxietilenéter y polioxietilenéster

- 45 Adyuvantes adecuados para usar en la invención incluyen polioxietilenéteres y polioxietilenésteres [78]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de polioxietilenéster de sorbitano en combinación con un octoxinol [79] así como tensioactivos de polioxietilenéter o éster de alquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [80]. Los polioxietilenéteres preferidos se selecciona del siguiente grupo: Polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

- 50 Las formulaciones de PCPP se describen en, por ejemplo, las referencias 81 y 82.

L. Péptidos de muramilo

Ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para usar como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina MTP-PE).

5 M. Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para usar adyuvantes en la invención incluyen Imiquimod y sus homólogos (p. ej., "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las referencias 83 y 84.

La invención puede también comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados con anterioridad. Por ejemplo, las siguientes composiciones adyuvantes se pueden usar en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [85]; (2) una saponina (p. ej., QS21) + un derivado de LPS no tóxico (p. ej., 3dMPL) [86]; (3) una saponina (p. ej., QS21) + un derivado de LPS no tóxico (p. ej., 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (p. ej., QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [87]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [88]; (6) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80TM, 5% de polímero de bloque-plurónico L121 y thr-MDP, bien microfluidizados en una emulsión en submicrones o agitados en vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande. (7) Sistema adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo constituido por monofosforilo lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxTM) y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

20 Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se divulgan en el capítulo 7 de la referencia 22.

Sales de aluminio (fosfatos de aluminio y, particularmente hidroxifosfatos y/o hidróxidos y, en particular, oxihidróxido) y MF59 son adyuvantes preferidos para inmunización parenteral. Los mutantes de toxina son adyuvantes mucosos preferidos. El QS21 es otro adyuvante útil para NMB1870, que se puede usar solo o en combinación con uno o más otros diversos adyuvantes, por ejemplo con una sal de aluminio.

25 Péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina MTP-PE), etc.

Otros componentes antigénicos

30 Las composiciones de la invención incluyen secuencias de NMB1870. Es particularmente preferido que la composición no incluya mezclas complejas o no definidas de antígenos, por ejemplo se prefiere no incluir vesículas de la membrana externa en la composición. Los polipéptidos de la invención se expresan, preferentemente, de forma recombinante en un huésped heterólogo y después se purifican.

Además de incluir una secuencia de NMB1870, una composición de la invención también puede incluir uno o más antígenos de *Neisseria* adicionales, como una vacuna dirigida a más de un antígeno por bacteria disminuye la posibilidad de seleccionar mutantes de escape. Los antígenos de *Neisseria* para incluir en las composiciones incluyen polipéptidos que comprenden uno o más de:

(a) las 446 SEC ID pares (es decir, 2, 4, 6, ..., 890, 892) divulgadas en la referencia 89.

(b) las 45 SEC ID pares (es decir, 2, 4, 6, ..., 88, 90) divulgadas en la referencia 90;

40 (c) las 1674 SEC ID pares 2-3020, SEC ID pares 3040-3114, y todas las SEC ID 3115-3241, divulgadas en la referencia 3;

(d) las 2160 secuencias de aminoácidos de NMB0001 a NMB2160 de la referencia 2;

(e) una proteína PorA de meningococos, de cualquier subtipo, preferentemente expresada de forma recombinante

(f) una variante, homólogo, ortólogo, parálogo, mutante etc. de (a) a (e); o

45 (g) una preparación de vesículas de la membrana externa de *N. meningitidis* [p. ej., véase la ref. 182].

Además de antígenos polipeptídicos de *Neisseria*, la composición puede incluir antígenos para inmunizar contra otras enfermedades o infecciones. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los antígenos adicionales siguientes:

- un antígeno sacárido de *N. meningitidis*, serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el oligosacárido divulgado en la referencia 91, del serogrupo C [véase también la referencia 92] o los oligosacáridos de la referencia 93.
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [p. ej., 94, 95, 96].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivados [p. ej., 97, 98].
- 5 - un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o del núcleo [p. ej., 98, 99].
- un antígeno de difteria, tal como el toxoide de la difteria [p. ej., capítulo 3 de la referencia 100], por ejemplo el mutante CRM197 [p. ej., 101].
- un antígeno del tétanos, tal como el toxoide del tétanos [p. ej., capítulo 4 de la referencia 100].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [p. ej., referencias 102 y 103].
- 10 - un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [p. ej., 92].
- antígeno(s) de la polio [p. ej., 104, 105] tal como IPV.
- antígenos del sarampión, paperas y/o rubéola [p. ej., capítulos 9, 10 y 11 de la referencia 100].
- 15 - antígeno(s) de la gripe [p. ej., capítulo 19 de la referencia 100] tal como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [p. ej., 106].
- un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) [p. ej., 107, 108].
- un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B).
- 20 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) [p. ej., 108, 109, 110].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [p. ej., 111].

La composición puede comprender uno o más de estos otros antígenos:

Los antígenos de proteínas tóxicas se pueden destoxificar cuando sea necesario (p. ej., destoxificación de la toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [103]).

- 25 Cuando un antígeno de difteria está incluido en la composición, también se prefiere incluir los antígenos del tétanos y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno del tétanos está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno de pertussis está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y del tétanos. Por tanto, se prefieren las combinaciones de DTP.

- 30 Preferentemente, los antígenos sacáridos están en forma de conjugados. Las proteínas transportadoras para estos conjugados se tratarán más detalladamente más adelante.

Normalmente, los antígenos en la composición estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno.

- 35 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden usarse terapéuticamente (*es decir*, para tratar una infección existente) o profilácticamente (*es decir*, para prevenir una infección futura).

Como alternativa al uso de antígenos proteicos en las composiciones inmunogénicas de la invención se puede usar el ácido nucleico que codifica el antígeno (preferentemente ADN, por ejemplo en forma de un plásmido).

- 40 Composiciones particularmente preferidas de la invención incluyen uno, dos o tres de: (a) antígenos sacáridos de los serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococos; (b) un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B; y/o (c) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.

Serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente A) de meningococo

Las vacunas de polisacáridos contra los serogrupos A, C, W135 e Y se han conocido durante muchos años. Estas vacunas (MENCEVAX ACWY™ y MENOMUNE™) se basan en los polisacáridos capsulares de los organismos y, aunque son eficaces en adolescentes y adultos, proporcionan una respuesta inmunitaria mala y una duración corta de la protección, y no pueden usarse en lactantes.

En contraste con los antígenos polisacáridos no conjugados en estas vacunas, las vacunas del serogrupo C recientemente aprobadas (Menjugate™ [112, 91], Meningitec™ y NeisVac-C™) incluyen sacáridos conjugados. Menjugate™ y Meningitec™ tienen antígenos oligosacáridos conjugados con un transportador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac-C™ usa el polisacárido completo (des-O-acetilado) conjugado con un transportador del toxoide del tétanos. La vacuna Menactra™ contiene antígenos sacáridos capsulares conjugados de cada uno de los serogrupos Y, W135, C y A.

Las composiciones de la presente invención incluyen, preferentemente, antígenos sacáridos capsulares de uno o más de los serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococos, en las que los antígenos están conjugados a proteína(s) transportadora(s) y/o son oligosacáridos. Por ejemplo, la composición puede incluir un antígeno sacárido capsular de: serogrupo C; serogrupos A y C; serogrupos A, C y W135; serogrupos A, C e Y; serogrupos C, W135 e Y; de los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y.

Una cantidad típica de cada antígeno sacárido de meningococo por dosis está entre 1 µg y 20 µg, *por ejemplo* aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg (expresados en forma de sacárido).

Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A y C, la proporción (p/p) del sacárido MenA:sacárido MenC puede ser superior a 1 (p. ej., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares del serogrupo Y y de uno o los dos serogrupos C y W135, la proporción (p/p) del sacárido MenY:sacárido MenW135 puede ser superior a 1 (p. ej., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor) y/o la proporción (p/p) del sacárido MenY:sacárido MenC puede ser inferior a 1 (p. ej., 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, o menor). Las proporciones (p/p) preferidas para los sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1. Las proporciones (p/p) preferidas para los sacáridos de los serogrupos C:W135:Y son: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1; y 2:1:1. Se prefiere usar una masa sustancialmente igual de cada sacárido.

En general, los sacáridos capsulares se usan en forma de oligosacáridos. Estos se forman de forma conveniente mediante fragmentación del lipopolisacárido capsular purificado (p. ej., mediante hidrólisis), que normalmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

La fragmentación de los polisacáridos se realizan, preferentemente, para dar un grado medio final de polimerización (GP) en el oligosacárido inferior a 30 (p. ej., entre 10 y 20, preferentemente de aproximadamente 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferentemente de aproximadamente 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El GP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [113].

Si se realiza hidrólisis, se medirá el tamaño del hidrolizado con el fin de eliminar los oligosacáridos de longitud corta [92]. Esto se puede conseguir de varios modos, tales como ultrafiltración seguida por cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior o igual a aproximadamente 6 se eliminan, preferentemente, para el serogrupo A y los inferiores a aproximadamente 4 son preferentemente eliminados para los serogrupos W135 e Y.

Los antígenos sacáridos MenC preferidos se divulgan en la referencia 112 y se usan en Menjugate™.

El antígeno sacárido puede modificarse químicamente. Esto es particularmente útil para reducir la hidrólisis para el serogrupo A [114; véase más adelante]. Se puede realizar la des-O-acetilación de los sacáridos meningocócicos. Para los oligosacáridos, la modificación puede tener lugar antes o después de la despolimerización.

Cuando una composición de la invención incluye un antígeno sacárido MENA, el antígeno es, preferentemente, un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo en el sacárido nativo se ha/han reemplazado por un grupo de bloqueo [114]. Esta modificación mejora la resistencia a la hidrólisis.

Normalmente, los polisacáridos capsulares meningocócicos se preparan mediante un procedimiento que comprende las etapas de precipitación de polisacárido (p. ej., usando un detergente catiónico), fraccionamiento en etanol, extracción en fenol frío (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar el LPS) [p. ej., referencia 115]. No obstante, un procedimiento más preferido [93] implica precipitación del polisacárido seguida por solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol menor. La precipitación se puede conseguir usando un detergente

cationico tal como sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (p. ej., las sales de bromuro) o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Particularmente preferido es el bromuro de cetiltrimetilamonio ("CTAB") [116]. La solubilización del material precipitado se puede conseguir usando un alcohol menor tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles *etc.*, pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar los complejos CTBA-polisacárido. Preferentemente se añade etanol al polisacárido precipitado para dar una concentración final (sobre la base del contenido total de etanol y agua) de entre 50% y 95%.

Después de la resolubilización, el polisacárido se puede tratar adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que ni siquiera la menor contaminación es aceptable (p. ej., para la producción de vacunas humanas). Normalmente esto implicará una o más etapas de filtración, por ejemplo filtración en profundo, se puede usar filtración a través de carbón activado, filtración por tamaño y/o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar los contaminantes, el polisacárido se puede precipitar para tratamiento y/o procesamiento adicional. Esto se puede conseguir de forma conveniente intercambiando cationes (*p. ej.*, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

Como alternativa a la purificación se pueden obtener sacáridos capsulares mediante síntesis total o parcial, *por ejemplo* la síntesis Hib se divulga en la referencia 117 y la síntesis de MenA en la referencia 118.

Cuando la composición comprende sacárido capsular del serogrupo A se prefiere que el sacárido del serogrupo A no se combine con el(los) otro(s) sacárido(s) hasta poco antes de usar, con el fin de minimizar el potencial de hidrólisis. Esto se puede alcanzar de forma conveniente teniendo el componente del serogrupo A (normalmente junto con los excipientes adecuados) en forma liofilizada y el(los) otro(s) componente(s) del serogrupo en forma líquida (también con los excipientes adecuados), usándose los componentes líquidos para reconstituir el componente de MENA liofilizado cuando se vaya a usar. Cuando se usa una sal de adyuvante como aluminio se prefiere incluir el adyuvante en el vial que contiene la vacuna líquida y liofilizar el componente MenA sin adyuvante.

Por tanto, se puede preparar una composición de la invención a partir de un kit que comprende: (a) sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A, en forma liofilizada; y (b) los otros antígenos de la composición en forma líquida. La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición de la invención, que comprende mezclar un sacárido capsular liofilizado de *N. meningitidis* del serogrupo A con los otros antígenos, en la que dichos antígenos están en forma líquida.

En cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual estará, en general, entre 1-50 μg (medidos en masa de sacárido), prefiriéndose aproximadamente 2,5 μg , 5 μg o 10 μg de cada uno. Con proporciones en peso para A:C:W135:Y de 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1, por tanto, la cantidad representada por el número es, preferentemente, de aproximadamente 2,5 μg , 5 μg o 10 μg . Para una proporción de la composición A:C:W:Y de y 1:1:1:1 y 10 μg por sacárido, se administran 40 μg de sacárido por dosis. Las composiciones preferidas tienen aproximadamente los siguientes μg de sacárido por dosis:

A	10	0	0	0	10	5	2,5
C	10	10	5	2,5	5	5	2,5
W135	10	10	5	2,5	5	5	2,5
Y	10	10	5	2,5	5	5	2,5

Las composiciones preferidas de la invención comprenden menos de 50 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden $\leq 20 \mu\text{g}$ de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden 30 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden 25 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden 20 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden $\leq 10 \mu\text{g}$ de sacárido meningocócico por dosis, pero, idealmente, las composiciones de la invención comprenden al menos 10 μg de sacárido meningocócico por dosis.

Los conjugados Menjugate™ y NeisVac™ MenC usan un adyuvante hidróxido, mientras que Meningitec™ usa un fosfato. Es posible en las composiciones de la invención adsorber algunos antígenos sobre un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos asociados con un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes de serogrupos, por ejemplo, se dispone de las permutaciones siguientes:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)															
A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Para combinaciones trivalentes de serogrupos de *N. meningitidis*, se dispone de las permutaciones siguientes:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

Haemophilus influenzae de tipo B

- 5 Cuando la composición incluye un antígeno de *H. influenzae* tipo b, normalmente incluirá un antígeno sacárido capsular Hib. Los antígenos sacáridos de *H. influenzae* b son bien conocidos.

De forma ventajosa, el sacárido Hib está conjugado covalentemente a una proteína transportadora con el fin de potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos en general y del polisacárido capsular de Hib en particular está bien documentada [p. ej., referencias 119 a 127 etc.]. La invención puede usar cualquier conjugado Hib. Proteínas transportadoras adecuadas se describen más adelante y los transportadores preferidos para sacáridos Hib son Crazy ('HbOC'), toxoide del tétanos ('PRP-T') y el complejo de membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

El resto sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (p. ej., polirribosilribitol fosfato de longitud completa (PRP)), pero se prefiere hidrolizar polisacáridos para formar oligosacáridos (p. ej., PM de ~ 1 a ~ 5 kDa).

- 15 Un conjugado preferido comprende un oligosacárido Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ a través de un ligador de ácido adípico [128, 129]. El toxoide del tétanos también es un transportador preferido.

Las composiciones de la invención pueden comprender más de un antígeno Hib.

Cuando una composición incluye un antígeno sacárido Hib se prefiere que tampoco incluya un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, el antígeno Hib puede adsorberse en el adyuvante [130] o puede no adsorberse [131].

Los antígenos Hib puede estar liofilizados, *por ejemplo* junto con antígenos meningocócicos.

Streptococcus pneumoniae

- 25 Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, normalmente será un antígeno sacárido capsular que preferentemente está conjugado con una proteína transportadora [p. ej., referencias 94-96]. Se prefiere incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes se usan ampliamente, ya que son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [132]. Por ejemplo, PreVNar™ [133] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con CRM₁₉₇ mediante aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 µg de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos sobre adyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluye, preferentemente, al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden adsorberse sobre fosfato de aluminio.

- 30 Como alternativa al uso de antígenos sacáridos de neumococos, la composición puede incluir uno o más antígenos polipeptídicos. Se dispone de secuencias genómicas para varias cepas de neumococos [134, 135] y se pueden someter a vacunología inversa [162-139] para identificar antígenos polipeptídicos adecuados [140, 141]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los antígenos siguientes: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128 y Sp130, como se ha definido en la referencia 142.

En algunas formas de realización, la composición puede incluir los antígenos sacárido y polipeptídico de neumococo.

Estos se pueden usar en mezcla simple, o el antígeno sacárido neumocócico puede conjugarse con una proteína neumocócica. Proteínas transportadoras adecuadas para dichas formas de realización incluyen los antígenos indicados en el párrafo anterior [142].

Los antígenos neumocócicos pueden estar liofilizados, *por ejemplo* junto con antígenos meningocócicos y/o Hib.

5 Conjugación covalente

Normalmente, los sacáridos capsulares en las composiciones de la invención estarán conjugados con proteína(s) transportadora(s). En general, la conjugación potencia la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte de antígenos independientes de linfocitos T en antígenos dependientes de linfocitos T, lo que permite la iniciación de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida [p. ej., revisada en las referencias 143 y 119-127].

Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como el toxoide de difteria o el toxoide del tétanos. El toxoide de difteria mutante CRM₁₉₇ [144, 145, 146] es particularmente preferido. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [147], péptidos sintéticos [148,149], proteínas del shock térmico [150,151], proteínas de pertussis [152,153], proteína D de *H. influenzae* [154, 155], citocinas [156], linfocinas [156], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4+ humanas de varios antígenos derivados de patógenos [157], proteínas de estreptococos, hormonas [156], factores de crecimiento [156], proteína de superficie neumocócica PspA [158], toxina A o B de *C. difficile* [159], proteínas de captación de hierro [160], etc. Una proteína transportadora preferida es CRM197.

Dentro de una composición de la invención es posible usar más de una proteína transportadora, *por ejemplo* para reducir el riesgo de supresión del transportador. Por tanto, se pueden usar diferentes proteínas transportadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A se podrían conjugar con CRM₁₉₇ mientras que los sacáridos del serogrupo C podrían conjugarse con el toxoide del tétanos. También es posible usar más de una proteína transportadora para un antígeno sacárido concreto, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM₁₉₇ y otros conjugados con el toxoide del tétanos. No obstante, en general, se prefiere usar la misma proteína transportadora para todos los sacáridos.

Una proteína transportadora única podría transportar más de un antígeno sacárido [161]. Por ejemplo, Una proteína transportadora única podría tener conjugados sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos se pueden mezclar antes de la reacción de conjugación. No obstante, en general, se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo.

Se prefieren los conjugados con una proporción sacárido: proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido). Se prefieren las proporciones de 1:2 y 5:1, como son más preferidas las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Para MenA y MenC se prefiere un exceso de la proteína transportadora.

Los conjugados se pueden usar junto con la proteína transportadora libre [162]. Cuando una proteína transportadora dada está presente en forma tanto libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es, preferentemente, no superior al 5% de la cantidad total de la proteína transportadora en la composición como un todo y, más preferentemente, presente a menos del 2% en peso.

Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligador adecuado cuando sea necesario.

Normalmente, el sacárido se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (p. ej., 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [163,164, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 125).

Se pueden establecer enlaces a través de un grupo ligador usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 165 y 166. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo ligador de ácido adípico y, después, acoplamiento de una proteína en el otro extremo del grupo ligador de ácido adípico [123,167,168]. Otros ligadores incluyen B-propionamido [169], nitrofenil-etilamina [170], haluros de haloacilo [171], enlaces glicosídicos [172], ácido 6-aminocaproico [173], ADH [174], restos de C₄ a C₁₂ [175] etc. Como alternativa al uso de un ligador, se puede usar enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido, seguida de aminación reductora con la proteína, tal como se ha descrito en, por ejemplo, las referencias 176 y 177.

Un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (p. ej., mediante sustitución de los grupos =O terminales con -NH₂), seguido por derivación con un diéster adípico (p. ej., N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico) y se prefiere la reacción con la proteína transportadora. Otra reacción preferida usa activación con CDAP con una proteína D transportadora, por ejemplo MenA o MenC.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados se pueden separar. Hay muchos procedimientos adecuados, incluidos cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc. [véanse también las referencias 178 y 179, etc.].

- 5 Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, se prefiere que la preparación de los oligosacáridos preceda a la conjugación.

Vesículas de la membrana externa

- 10 Se prefiere que las composiciones de la invención no incluyan mezclas complejas o no definidas de antígenos, que son características típicas de las VME. No obstante, la invención se puede usar junto con VME, ya que se ha descubierto que el NMB1870 potencia su eficacia [6], en particular sobreexpresando los polipéptidos de la invención en las cepas usadas para la preparación de VME.

- 15 Este enfoque se puede usar en general para mejorar las preparaciones de microvesículas de *N. meningitidis* del serogrupo B [180], "VME nativas" [181], ampollas o vesículas de la membrana externa [p. ej., referencias 182 a 187 etc.]. Estas se pueden preparar a partir de bacterias que se han manipulado genéticamente [188-191], por ejemplo para incrementar la inmunogenicidad (p. ej., hiperexpresar inmunógenos), para reducir la toxicidad, para inhibir la síntesis de polisacáridos capsulares, para regular por disminución la expresión de PorA etc. Se pueden preparar a partir de cepas con hiperformación de ampollas [192-195]. Se pueden incluir vesículas de una *Neisseria* no patogénica [196]. Las VME se pueden preparar sin el uso de detergentes [197,198]. Pueden expresar proteínas que no sean de *Neisseria* sobre su superficie [199]. Pueden carecer de LPS. Se pueden mezclar con antígenos recombinantes [182, 200]. Se pueden usar vesículas de bacterias con diferentes subtipos de proteína de membrana externa de clase I, por ejemplo seis subtipos diferentes [201,202] usando dos poblaciones de vesículas diferentes sometidas a ingeniería genética, mostrando cada una tres subtipos, o nueve subtipos diferentes usando tres poblaciones de vesículas diferentes sometidas a ingeniería genética, mostrando cada una tres subtipos etc. Los subtipos útiles incluyen:

P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1; P1.18-1,3,6.

25 *Expresión de proteínas*

- En la técnica se conocen técnicas de expresión en bacterias. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unir la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción posterior (3') de una secuencia codificadora (p. ej., gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que normalmente está proximal al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de iniciación de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión para la ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano puede también tener un segundo dominio denominado operador que puede solaparse con un sitio de unión a la ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción negativa regulada (inducible), ya que una proteína represora génica se puede unir al operador y, de este modo, inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva se puede producir en ausencia de elementos reguladores negativos, tal como el operador. Además, la regulación positiva se puede conseguir con una secuencia de unión a una proteína activadora génica, que, si está presente, normalmente está proximal (5') a la secuencia de unión de la ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora génica es la proteína activadora de catabolitos (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud y col. (1984) Annu. Rev. Genet. 18:173]. Por tanto, la expresión regulada puede ser positiva o negativa, de modo que potencia o reduce la transcripción.

- 40 Las secuencias que codifican enzimas de la vía metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas del metabolismo del azúcar, tales como galactosa, lactosa (lac) [Chang y col. (1977) Nature 198:1056], y maltosa. Ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas, tales como triptófano [Goeddel y col. (1980) Nuc. Acids Res. 8:4057; Yelverton y col. (1981) Nucl. Acids Res. 9:731; patente de EE.UU. 4.738.921; documento EP-A-0036776 y documento EP-A-0121775]. El sistema promotor de la β -lactamasa (bla) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." en Interferon 3 (ed. I. Gresser)], los sistemas promotores del bacteriófago lambda PL [Shimatake y col. (1981) Nature 292:128] y T5 [patente de EE.UU. 4.689.406] también proporcionan secuencias promotoras útiles. Otro promotor de interés es un promotor de arabinosa inducible (pBAD).

- 50 Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o de bacteriófago se pueden unir con las secuencias operones de otro promotor bacteriano o de bacteriófago, lo que crea un promotor híbrido sintético [patente de EE.UU. 4.551.433]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor híbrido trp-lac compuesto por el promotor trp y las secuencias del operón lac, que está regulado por el represor lac [Amann y col. (1983) Gene 25:167; de Boer y col. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores naturales de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unir la ARN polimerasa bacteriana e

iniciar la transcripción. Un promotor natural de origen no bacteriano también se puede acoplar a una ARN polimerasa compatible para producir niveles altos de expresión de algunos genes en procariotas. El sistema promotor/ARN polimerasa del bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor acoplado [Studier y col. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; Tabor y col. (1985) Proc Natl. Acad. Sci. 82:1074]. Además, un promotor híbrido también puede estar compuesto por un promotor de bacteriófago y una región operador de *E. coli* (EPO-A-0 267 851).

Además de una secuencia promotora funcionante, un sitio de unión al ribosoma eficiente también es útil para la expresión de genes extraños en procariotas. En *E. coli*, el sitio de unión al ribosoma se denomina secuencia de Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de iniciación (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos antes del codón de iniciación. Se piensa que la secuencia SD estimula la unión del ARNm al ribosoma mediante el apareamiento de las bases entre la secuencia SD y el extremo 3' y del ARNr 16S de *E. coli* [Steitz y col. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." en Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. R.F. Goldberger)]. Para expresar genes eucarióticos y genes procarióticos con un sitio de unión al ribosoma débil [Sambrook y col. (1989) "Expression of cloned genes in Escherichia coli." en Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Una secuencia promotora puede estar unida directamente a la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N siempre será una metionina, que está codificada por el codón de iniciación ATG. Si se desea, la metionina en el extremo N puede escindirse de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o mediante incubación *in vivo* o *in vitro* con una metionina N-terminal peptidasa bacteriana (documento EP-A-0219237).

Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por las bacterias son regiones reguladoras localizadas en 3' del codón de terminación de la traducción y, por tanto, junto con promotor que flanquea la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el polipéptido codificado por el ADN. Las secuencias de terminación de la transcripción incluyen con frecuencia secuencias de ADN de aproximadamente 50 nucleótidos capaces de formar estructuras de tipo bucle en tallo que ayudan a terminar la transcripción. Ejemplos incluyen secuencias de terminación de la transcripción derivadas de genes con promotores fuertes, tales como el gen *trp* en *E. coli*, así como otros genes biosintéticos.

Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una secuencia señal (si se desea), la secuencia de codificación de interés y la secuencia de terminación de la transcripción, se introducen en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (p. ej., plásmidos) capaces del mantenimiento estable en un huésped, como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, de modo que le permite mantenerse en un huésped procariota para la expresión o para clonación y amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido con un número alto o bajo de copias. Generalmente, un plásmido con un número alto de copias tendrá un número de copias que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 y, normalmente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido de número alto de copias contendrá, preferentemente, al menos aproximadamente 10 y, más preferentemente, al menos aproximadamente 20 plásmidos. Se puede seleccionar un vector de número alto o bajo de copias, en función del efecto del vector y la proteína extraña del huésped.

Como alternativa, las construcciones de expresión se pueden integrar en el genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración normalmente contienen al menos una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite que el vector se integre. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores de integración construidos con ADN de varias cepas de *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (documento EP-A-0127328). Los vectores de integración también pueden estar compuestos del bacteriófago o las secuencias del transposón.

Normalmente, las construcciones extracromosómicas y de la expresión de integración pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de cepas bacterianas que se han transformado. Los marcadores seleccionables se pueden expresar en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que hacen a la bacteria resistente a fármacos tales como ampicilina, cloranfenicol, Eritromicina, kanamicina (neomicina) y tetraciclina [Davies y col. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469]. Los marcadores seleccionables pueden también incluir genes biosintéticos, tales como los que están en las vías biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

Como alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente se pueden introducir en vectores de transformación.

Los vectores de transformación normalmente están compuestos por un marcador seleccionable que se mantiene en un replicón o se desarrolla en un vectores de integración, como se ha descrito anteriormente. Los vectores de expresión y de transformación, bien replicones extracromosómicos o vectores de integración, se han desarrollado para la transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, los vectores de expresión se han desarrollado para, entre otras, las bacterias siguientes: *Bacillus subtilis* [Palva y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; documento

EP-A-0 036 259 y documento EPA-0 063 953; documento WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake y col. (1981) Nature 292:128; Amann y col. (1985) Gene 40:183; Studier y col. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; documento EP-A-0 036 776, documento EP-A-0 136 829 y documento EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* (Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655],
 5 *Streptomyces lividans* [patente de EE.UU. 4.745.056].

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos son bien conocidos en la técnica y normalmente incluyen la transformación de bacterias tratadas con CaCl₂ u otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. El ADN también se puede introducir en células bacterianas mediante electroporación. Normalmente los procedimientos de transformación varían con la especie bacteriana que se va a transformar.
 10 Véase, por ejemplo, [Masson y col. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; documento EP-A-0 036 259 y documento EP-A-0 063 953; documento WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang y col. (1990) J. Bacteriol. 172:949, *Campylobacter*], [Cohen y col. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower y col. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids. en , Genetic Engineering: Proceedings of
 15 the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W. Boyer and S. Nicosia); Mandel y col. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*], [Chassy y col. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler y col. (1988) Anal. Biochem 170:38, *Pseudomonas*]; [Augustin y col. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, *Staphylococcus*], [Barany y col. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, en: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti and R. Curtiss
 20 III); Perry y col. (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti y col. (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1:412, *Streptococcus*].

General

El término "que comprende" abarca (que incluye" además de "constituido por", *por ejemplo* una composición "que comprende" X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo* X + Y.

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

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", *por ejemplo*, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

30 "identidad de secuencia" se determina, preferentemente, con el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización por hueco abierto= 12 y penalización por extensión de hueco= 1.

Después del serogrupo, la clasificación de meningococos incluye el serotipo, el serosubtipo y, después, el inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera serogrupo, serotipo, serosubtipo e inmunotipo, cada uno separado por dos puntos, por ejemplo B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes producen enfermedad a menudo (hiperinvásiva), algunos linajes producen formas más graves de la enfermedad que otros (hipervirulentos) y
 35 otros rara vez producen enfermedad. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, a saber los subgrupos I, III y IV-1, el complejo ET-5, el complejo ET-37, el clúster A4 y el linaje 3. Éstos se han definido mediante electroforesis enzimática de multilocus (MLEE), pero también se ha usado el tipado de secuencias en multilocus (MLST) para clasificar los meningococos [ref. 18]. Los cuatro clúster hipervirulentos principales son los complejos ST32, ST44,
 40 ST8 y ST11.

En general, la invención no abarca las diversas secuencias de NMB1870 divulgadas específicamente en las referencias 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 203, aunque estas secuencias de NMB1870 se pueden usar de acuerdo con la invención para, por ejemplo, la construcción de secuencias quiméricas, etc.

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

Sustituciones

La SEC ID N° 59 se divulga en la referencia 13 como una quimera de NMB1870 de las familias I, II y III. Este polipéptido se obtiene mediante sustituciones en siete regiones de la SEC ID N° 1, que se identifica más adelante:

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLK
 LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQ
 IQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGNNG
 KIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTVNG
 IRHIGLAAKQ (SEC ID N° 1)

Aunque esta quimera produjo anticuerpos que eran bactericidas contra meningococos de cada familia de NMB1870, las respuestas contra las cepas de la familia II y la familia III no eran elevadas de forma consistente.

5 Combinando diversos enfoques, incluida una estructura 3D derivada en RMN del dominio BC de un polipéptido de la familia I, los inventores descubrieron que los residuos 162-168 (segunda región subrayada) están rodeados por un parche de aminoácidos que se conservan entre MC58 de meningococos (Familia I) y 2996 (familia II). Por tanto, la sustitución creó una extensa área similar a 2996 sobre la superficie del polipéptido MC58, lo que podría explicar por qué las quimeras que incluyen esta sustitución podrían producir una respuesta bactericida contra las cepas de la familia II.

10 La sustitución en la tercera región subrayada (ProAsn en lugar de AlaGly) probablemente alteró la conformación de la estructura local introduciendo un grado alto de rigidez que alteró el plegamiento del polipéptido y redijo la actividad bactericida.

15 En función de una comparación de (i) alineaciones de secuencias dentro de la familia II y entre familias (II), se identificó la reactividad cruzada en suero de los residuos de aminoácidos, lo que podría mejorar la capacidad de una quimera para producir una buena respuesta anti-II.

20 Estos residuos son: (a) expuestos en la superficie, basado en la estructura de RMN y, por tanto, son inmunoaccesibles; (b) conservado dentro de las cepas de la familia II que no se mataban mediante el suero anti-2996; y (c) no en el bolsillo hidrofóbico de la proteína. Numerados de acuerdo con la SEC ID N° 2, estos residuos fueron: D121; D165; A180; G181; K183; T185; T187; A191; A192; H196; K198; A213; S234; y G261. A excepción de D121 and D165, cada uno de estos residuos se conservó en tres cepas que eran resistentes a los antisueros producidos contra la secuencia 2996, D121 es N en una de las tres cepas y D 165 es S en dos de las tres cepas. Por tanto, la SEC ID N° 57 estaba alterada, para dar la SEC ID N° 60, que estaba presente como parte de una secuencia de NMB1870 de longitud completa.

25 La secuencias KLEGGGR 7-mer (SEC ID N° 61) en la SEC ID N° 57 se reemplazó con el producto de 6 (SEC ID N° 62). Por tanto, se deleciona un aminoácido, En función de cómo están alineadas estas dos secuencias, después de delecionar el residuo para su sustitución en E51, G52, G53 o R54. El resultado final no depende de qué resultado normalmente no se deleciona, pero se pasa en la alineación de la referencia 4, el residuo delecionado se describe mejor como E51,

30 Debe entenderse que la invención se ha descrito anteriormente únicamente a modo de ejemplo y que se pueden realizar modificaciones permaneciendo dentro del alcance de la invención.

REFERENCIAS

[1] Jodar y col. (2002) Lancet 359(9316):1499-1508.

[2] Pizza y col. (2000) Science 287:1816-1820.

[3] WO99/57280.

35 [4] Massignani y col. (2003) J Exp Med 197:789-799.

[5] Welsch y col. (2004) J Immunol 172:5605-15.

[6] Hou y col. (2005) J Infect Dis 192(4):580-90.

[7] WO03/063766.

[8] Fletcher y col. (2004) Infect Immun 72:2088-2100.

40 [9] Zhu y col. (2005) Infect Immun 73(10):6838-45.

[10] WO01/64920.

- [11] WO03/020756.
- [12] WO2004/048404.
- [13] WO2006/024954.
- [14] Needleman & Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
- 5 [15] Rice y col. (2000) Trends Genet 16:276-277.
- [16] Achtman (1995) Global epidemiology of meningococcal disease. Pages 159-175 of Meningococcal disease (ed. Cartwright). ISBN: 0-471-95259-1.
- [17] Caugant (1998) APMIS 106:505-525.
- [18] Maiden y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3140-3145.
- 10 [19] WO01/30390.
- [20] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [21] WO03/009869.
- [22] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [23] WO00/23105.
- 15 [24] WO90/14837.
- [25] Patente de EE.UU. 5.057.540.
- [26] WO96/33739.
- [27] EP-A-0109942.
- [28] WO96/11711.
- 20 [29] WO00/07621.
- [30] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [31] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321,-338.
- [32] Niikura y col. (2002) Virology 293:273-280.
- [33] Lenz y col. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
- 25 [34] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
- [35] Gerber y col. (2001) Virol 75:4752-4760.
- [36] WO03/02448
- [37] WO03/024481
- [38] Gluck y col. (2002) Vaccine 20:B10-B16.
- 30 [39] EP-A-0689454.
- [40] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [41] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- [42] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
- [43] Pajak et al (2003) Vaccine 21:836-842.
- 35 [44] Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.

- [45] WO02/26757.
- [46] WO99/62923.
- [47] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
- [48] McCluskie y col. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.
- 5 [49] WO98/40100.
- [50] Patente de EE.UU. 6.207.646.
- [51] Patente de EE.UU. 6.239.116.
- [52] Patente de EE.UU. 6.429.199.
- [53] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
- 10 [54] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- [55] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
- [56] WO01/95935.
- [57] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306:948-953.
- [58] Bhagat y col. (2003) BBRC 300:853-861.
- 15 [59] WO031035836.
- [60] WO95/17211.
- [61] WO98/42375.
- [62] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
- [63] Pizza y col. (2001) Vaccine 19:2534-2541.
- 20 [64] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- [65] Schariton-Kersten y col. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.
- [66] Ryan y col. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
- [67] Partidos y col. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
- [68] Peppoloni y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.
- 25 [69] Pine y col. (2002) J Control Release 85:263-270.
- [70] Domenighini y col. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
- [71] WO99/40936.
- [72] WO99/44636.
- [73] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267-276.
- 30 [74] WO99/27960.
- [75] Patente de EE.UU. 6.090.406
- [76] Patente de EE.UU. 5.916.588
- [77] EP-A-0626169.
- [78] WO99/52549
- 35 [79] WO01/21207.

- [80] WO01/21152.
- [81] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [82] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [83] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- 5 [84] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [85] WO99/11241.
- [86] WO94/00153.
- [87] WO98/57659.
- [88] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.
- 10 [89] WO99/24578.
- [90] WO99/36544.
- [91] Costantino y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [92] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [93] WO03/007985.
- 15 [94] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [95] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [96] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [97] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [98] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- 20 [99] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [100] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [101] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- [102] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [103] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- 25 [104] Sutter y col. (2000) *Pediatr. Clin North Am* 47:287-308.
- [105] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [106] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [107] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- [108] WO02/34771.
- 30 [109] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [110] Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [111] Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; see also pages 1218-1219.
- [112] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [113] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- 35 [114] WO03/080678.

- [115] Frash (1990) p.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [116] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- [117] Kandil y col. (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
- [118] Berkin y col. (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
- 5 [119] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [120] Buttery & Moxon (2000) *JR Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [121] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [122] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [123] European patent 0477508.
- 10 [124] US patent 5,306,492.
- [125] WO98/42721
- [126] Dick y col. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [127] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [128] Kanra y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.
- 15 [129] Ravenscroft y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 35-47.
- [130] WO97/00697.
- [131] WO02/00249.
- [132] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440..
- [133] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- 20 [134] Tettelin y col. (2001) *Science* 293:498-506.
- [135] Hoskins et al (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.
- [136] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
- [137] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.
- [138] Massignani y col. (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
- 25 [139] Mora y col. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- [140] Wizemann y col. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [141] Rigden y col. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.
- [142] WO02/22167.
- [143] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- 30 [144] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002)
- [145] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [146] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [147] EP-A-0372501
- [148] EP-A-0378881
- 35 [149] EP-A-0427347

- [150] WO93/17712
- [151] WO94/03208
- [152] WO98/58668
- [153] EP-A-0471177
- 5 [154] WO00/56360
- [155] EP-A-0594610.
- [156] WO91/01146
- [157] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31 :3816-3824.
- [158] WO02/09199.
- 10 [159] WO00/61761
- [160] WO01/72337
- [161] WO99/42130
- [162] WO96/40242
- [163] Lees y col. (1996) Vaccine 14:190-198.
- 15 [164] WO95/0834
- [165] Patente de EE.UU. 4.882.317
- [166] Patente de EE.UU. 4.695.624
- [167] Porro y col. (1985) Mol Immunol 22:907-919.s
- [168] EP-A-0208375
- 20 [169] WO00/10599
- [170] Gever y col. Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- [171] US patent 4,057,685.
- [172] Patentes de EE.UU. 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [173] Patente de EE.UU. 4.459.286.
- 25 [174] Patente de EE.UU. 4.965.338
- [175] Patente de EE.UU. 4.663.160.
- [176] Patente de EE.UU. 4.761.283
- [177] Patente de EE.UU. 4.356.170
- [178] Lei y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.
- 30 [179] WO00/38711; Patente de EE.UU. 6.146.902.
- [180] WO02/09643.
- [181] Katial y col. (2002) Infect Immun 70:702-707.
- [182] WO01/52885.
- [183] Patente Europea 0301992.
- 35 [184] Bjune y col. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.

[185] Fukasawa y col. (1999) Vaccine 17:2951-2958.

[186] WO02/09746.

[187] Rosenqvist y col. (1998) Dev. Biol. Stand 92:323-333.

[188] WO01/09350.

5 [189] Patente Europea 0449958.

[190] EP-A-0996712.

[191] EP-A-0680512.

[192] WO02/062378.

[193] WO99/59625.

10 [194] Patente EE.UU. 6.180.111.

[195] WO01/34642.

[196] WO03/051379.

[197] Patente EE.UU. 6.558.677.

[198] WO2004/019977.

15 [199] WO02/062380

[200] WO00/25811.

[201] Peeters y col. (1996) Vaccine 14:1008-1015.

[202] Vermont y col. (2003) Infect Immun 71:1650-1655.

[203] WO2004/09459

20 **Breve descripción del listado de secuencia**

SEC ID Nº	Descripción
1	NMB1870 de la cepa MC58 - familia I
2	NMB 1870 de las cepas 961-5945 y 2996 - familia II
3	NMB1870 de la cepa M1239 - familia III
4-6	Dominios A a C de la SEC ID Nº 1
7-9	Dominios A a C de la SEC ID Nº 2
10-12	Dominios A a C de la SEC ID Nº 3
13	Dominio maduro A de la SEC ID Nº 4
14	Proteína 936 .
15-21	Ligadores etc.
22-24	Versiones ΔG de las SEC ID Nº 1, 2 y 3
25	SEC ID N 14 truncada°
26	Ligador
27-40	Híbridos y tándems

ES 2 369 937 T3

41-45	Ligadores etc.
45-46	Formas polimórficas de NNW 1870
57	Secuencia de referencia para las sustituciones
58-60	Secuencias químéricas
61-62	Secuencias barridas en la SEC ID N° 57
63-65	NMB 1870 de varias cepas
67-85	Cebadores
86-94	NMB 1870 de varias cepas
95	Forma ΔG de NMB 1870 de la cepa nm17

Lista de Secuencias

SEC ID N° 1- cepa MC58 - familia I

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAA
AKQGNKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLSGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

5

SEC ID N° 2 - cepas 961-5945 y 2996 - familia II

MNRTAFCCSLTAAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQHSAAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

10

SEC ID N° 3 – cepa M1239 - familia III

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQHSAAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDPNGL
HYSIDFTKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 4- Dominio A de la SEC ID N° 1

15

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYK

SEC ID N° 5- Dominio B de la SEC ID N° 1

20

QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGG

SEC ID N° 6- Dominio C de la SEC ID N° 1

25

KLTYTIDFAAKQGNKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLSGIFGGKAQEVAGS
AEVKTVNGIRHIGLAAKQ Q

SEC ID N° 7- Dominio A de la SEC ID N° 2

30

MNRTAFCCSLTAAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYK

SEC ID N° 8- Dominio B de la SEC ID N° 2

35

QDHSAAWALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDAGG
SEC ID N° 9- Dominio C de la SEC ID N° 2

KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGS
ATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 10- Dominio A de la SEC ID N° 3

40

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYK

SEC ID N° 11- Dominio B de la SEC ID N° 3

45

QNHSAAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDPNGL

SEC ID N° 12- Dominio C de la SEC ID N° 3

50

RLHYSIDFTKQGYGRIEHLRTLEQNUELAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGS
ATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 13 - Dominio maduro A de la SEC ID N° 4

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYK

5 SEC ID N° 14 - 936

MKPKPHTVRLIAAIFSLALSGCVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLGQVATE
GEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKV
ITLYQNYVQR

SEC ID N° 15

10 GSGGGG

SEC ID N° 16

15 GGGG

SEC ID N° 17

20 GPDSDRLQRR

SEC ID N° 18

GSGPDSDRLQRR

25 SEC ID N° 19

GKGPDSDRLQRR

SEC ID N° 20

30 HHHHHH

SEC ID N° 21

35 MGPDSDRLQRR

SEC ID N° 22- cepa MC58 - familia I, ΔG

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFCGSDDAGGKLTITIDFAAKQGNCKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTVNGIRHIGLAAKQ

40 SEC ID N° 23 - cepas 961-5945 y 2996 - familia II, ΔG

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQDH
SAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDAGGKLTITIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVFLAAAEKKA
DEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEVHEIGIAGKQ

45

SEC ID N° 24 – cepa M1239 - familia III, ΔG

50 VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQVYK
QNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAHEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKGQYGRIEHLKTLEQNVFLAAAE
LKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 25

VSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYI
TVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQR

5 **SEC ID N° 26**

MAS

10 **SEC ID N° 27**

MGPDSRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL
ESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPE
QNVELAAELKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKG
LQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMWAK
RQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSY
SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQLEHHHHH

SEC ID N° 28

MASVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVY
NYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRSGGGGVAAD
IGAGLADALTAPLDHKDKGSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALT
AFQTEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGK
RHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQ
SVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLG
GGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQLEHHHHH

15 **SEC ID N° 29**

MASVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVY
NYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRSGPDSRLQ
QRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYK
QDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAE
LKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQLEGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGSLQSLTLDQ

VRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKA
QEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQLEHHHHH

20 **SEC ID N° 30**

MGPDSRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL
ESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPE
QNVELAAELKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKG
LQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMWAK
RQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSY
SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGSLTLEDSIPQNGTLTSLAQAQAEKTF
KAGDKNSLNTGKLNKDISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAE
YHGKAFSSDPNGRLHYSIDFTKKQCYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVH
ETIGIAGKQKLHHHHH

25 **SEC ID N° 31**

MGPDSDRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITL
ESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP
QNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGPDSDRLQORRVAADIGTGLADALTAP
LDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTITLSAQGAETFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQITITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINN
PDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTR
YGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK
TYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRAT
YRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQLEHHHHH

SEC ID N° 32

MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQ
HSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADI
KPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGPDSDRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQ
SLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSF
LVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLAL
FGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGPDSDRLQORRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTITLSAQGAETFKAGD
KDNLSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQITITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGK
AFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGI
AGKQKLHHHHH

5

SEC ID N° 33

MGPDSDRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITL
ESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP
QNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKG
LQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVA
KRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSY
SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

10

SEC ID N° 34

MASVSAVIGSAVGAASAVDRRTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLHLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVY
NYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKIVITLYQNYVQRSGGGGVAAD
IGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALT
AFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGK
RHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGPDSDRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQ
SVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLG
GGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

15

SEC ID N° 35

MASVSAVIGSAVGAASAVDRRTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLHLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVY
NYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKIVITLYQNYVQRSGGPDSDRLQ
ORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYK
QDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAE
LKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQ
VRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKA
QEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

20 **SEC ID N° 36**

MGPDSDRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL
ESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAAQQGHGKIEHLKTPE
QNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGSPDSRLQORRVAADIGTGLADALTAP
LDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINN
PDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDT
YGESEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGVAAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK
TYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRAT
YRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTNVNGIR
HIGLAAKQ

SEC ID N° 37

MGPDSDRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL
ESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAAQQGHGKIEHLKTPE
QNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGVAAADIGAGLADALTAPLDHKDKG
LQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAK
RQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSY
SLGIFGGKAQEVAGSAEVTNVNGIRHIGLAAKQSGSPDSRLQORRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTF
KAGDKDNLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAE
YHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVH
EIGIAGKQ

5

SEC ID N° 38

MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQ
HSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADI
KPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTNVNGIRHIGLAAKQSGSPDSRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQ
LTLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRS
FLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAAQQGHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYHLAL
FGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGSPDSRLQORRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTFKAGD
KDNLSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGK
AFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGI
AGKQ

10 SEC ID N° 39

MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSH
SALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQQNGKIEHLKSELNVDLAAADIKD
KRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTNVNGIRHIGLAAKQSGSDRLQORRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDS
IPQNGTLTSLAQGAECTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNDKTDSLINQRSFLVSLG
GGEHTAFNQLGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYHLALFGDRAQ
EAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGSDRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLN
DKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTT
IDFAAQQGHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQLEHHHHH

SEC ID N° 40

15

MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQ
HSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADI
KPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTNVNGIRHIGLAAKQSGSPDSRLQORRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLK

LTLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQ
RSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYH
LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGSPDSRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYG
NGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGK
AFSSDDAGGKLYTTIDFAAQQGHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGI
AGKQ

20 SEC ID N° 41

LEHHHHHH

SEC ID N° 42

5 KL

SEC ID N° 43

10 M

SEC ID N° 44

LE

15 **SEC ID N° 45**

LEGGGG

SEC ID N° 46 - spo1061

20 MNRTAFCCLSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQNSALTALQTEQVQDSEHSGRMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEC ID N° 47 - spo1067

25 MNRTTFCCLSLTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAEKTFKAGGKDNSLNTGKLNK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQYKQNSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGL
HYTIDFTNKQGYGRIEHLKTPEQONVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIKEKVHEIGIACKQ

SEC ID N° 48- spo1160

30 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDK
VSRFDFIRQIEVDGRLITLESGEFQYKQNSALTALQTEQVQDSEDSRKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPESDRATYRGTAFSSDDAGGKLT
TIDFAVKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEC ID N° 49- spo1197

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQTITLASGEFQYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQONVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIACKQ

35 **SEC ID N° 50- spo1233**

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQONVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIACKQ

40 **SEC ID N° 51- spo1279**

MNRTAFCCLSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQTITLASGEFQYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQONVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIACKQ

SEC ID N° 52- spo1301

45 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQTITLASGEFQYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQONVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIACKQ

SEC ID N° 53- spo1310

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAECTYGNGLSLNTGKLNKDKISRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

5 **SEC ID N° 54- spo1325**

MNRTAFCCSLFTTTLILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLKLAQAQGAECTYGNGLSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSEKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGAQEVAGSAEVKTANGIHHIGLAAKQ

SEC ID N° 55- spo2020

10

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAECTYGNGLSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSEKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

15 **SEC ID N° 56- spo2068**

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEASIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGGRDNLNTGKLNKDKVSRFD
NDKVSFRFDVQKIEVDGQITLASGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSEKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA
HYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 57

20

FQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSEKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNV
DLAAADIKPDGKRHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTNGIRHIGLAAKQ

SEC ID N° 58

25

FQVYKQSHSALTALQIEKINNPDKIDSMVAQRSLVSDIAGEHTSFDQLPDGKATYRGTAFGSDDAGGKLHYTIDFAKQGHGRIEHLKSPELNV
LAAADIKADEKSHAVISGSVRYGSEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKIGEKVHEIGLAAKQ

SEC ID N° 59

30 **SEC ID N° 60**

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAECTYGNGLSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSEKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDQLPDGKATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAA
KQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKADEKSHAVISGSVLYGSEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKIGEKVHEIGLAAKQ

SEC ID N° 61

35

KLPEGGR

SEC ID N° 62

40

QLPDGK

SEC ID N° 63 - 4243 (I)

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLKLAQAQGAECTYGNGLSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTNGIRHIGLAAKQ

SEC ID N° 64 – B3937 (II)

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAERTYGNGLSLNTGKLKNDKVSFRD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTITIDFAA
KQCHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

5

SEC ID N° 65 – 24370 (II)

MNRTAFCCFLFTTALILTACSSGGGVAADIGVGLADALTTPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAERTYGNGLSLNTGKLKNDKVSFRD
FIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

10 **SEC ID N° 66**

GPDSDRLLQRRG

SEC ID N° 67

15

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

SEC ID N° 68

20

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 69

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

25

SEC ID N° 70

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

30

SEC ID N° 71

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

SEC ID N° 72

35

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 73

40

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

SEC ID N° 74

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

45

SEC ID N° 75

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

50

SEC ID N° 76

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 77

55

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

SEC ID N° 78

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

5 **SEC ID N° 79**

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

SEC ID N° 80

10 CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 81

15 CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

SEC ID N° 82

20 CCCGCTCGAGCTGTTTCCCGGCGATGCC

SEC ID N° 83

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

25 **SEC ID N° 84**

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 85

30 CGCGGATCCCATkTGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

SEC ID N° 86-gb013

35 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKA EYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 87- ng688

40 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD
FIRQIEVDGQTLITLASGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKA EYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 88- m3697

45 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTPLDHDKDKLSLTLED SIPQNGTLTLSAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKA EYHGKAFSSDDAGGKL
TYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

45 **SEC ID N° 89- m2441**

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTPLDHDKDKLSLTLED SIPQNGTLTLSAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKA EYHGKAFSSDDAGGKL
TYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 90- gb200

50

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGIHHIGLAQ

SEC ID N° 91- m4256

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGIHHIGLAQ

5

SEC ID N° 92- m2197

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGIRHIGLAQ

10

SEC ID N° 93- nm008

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGIRHIGLAQ

15

SEC ID N° 94- nm117

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGIRHIGLAQ

SEC ID N° 95- ΔG-nm117

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGIRHIGLAQ

20

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 85% con la SEC ID N° 57 y en la que uno o más de los residuos siguientes, En comparación con la SEC ID N° 57 está sustituido con otro aminoácido. A67; K70; K85; T147; N149; I39; K48; E51; R54; T56; A78; A79; D97; P105; S114; S116; L118; N120; Q121; A122, y en el que el polipéptido tiene la capacidad de inducir anticuerpos que son bactericidas contra cepas de cada una de las tres familias de NMB1870 I a III.
- 2.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de los residuos siguientes está sustituido; K48; E51; R54; A79; K85; P105; L118; N120; Q121; A122; T147; N149.
- 3.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de los residuos siguientes está sustituido; I39; T56; K70; A78; A79; K85; D97; S114; S116; L118.
- 4.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, que comprende una sustitución seleccionada de: K70R; K85R; T147I; N149E; I39L; K48Q; R54K; T56E; A78T; A79K; D97E; P105A; S114L; S116D; L118R; N120G; Q121S; A122E;.
- 5.- El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos 90 % con la SEC ID N° 57.
- 6.- Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. La composición de la reivindicación 6, que incluye un adyuvante.
8. Ácido nucleico que codifica un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.