

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 055**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99958434 .5**

96 Fecha de presentación: **07.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1137777**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2001**

54 Título: **NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS.**

30 Prioridad:
08.12.1998 GB 9826979
08.12.1998 GB 9826980
17.12.1998 GB 9828015
05.01.1999 GB 9900090

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.02.2012

73 Titular/es:
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:
RUELLE, J. y
VERLANT, V.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 055 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos compuestos derivados de *neisseria meningitidis*

Campo de la invención

La presente invención se refiere a polinucleótidos (denominados en lo sucesivo "polinucleótidos(s) BASB041", a polipéptidos codificados por ellos (denominados en lo sucesivo "polipéptido(s) BASB041" o "BASB041"), a materiales recombinantes y a procedimientos para su producción. En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para usar dichos polipéptidos y polinucleótidos, incluyendo vacunas contra infecciones bacterianas. En un aspecto adicional, la invención se refiere a ensayos diagnósticos para detectar la infección por ciertos patógenos.

Antecedentes de la invención

Neisseria meningitidis (meningococo) es una bacteria gramnegativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. En ocasiones provoca enfermedades invasivas bacterianas tales como bacteriemia y meningitis. La incidencia de la enfermedad meningocócica muestra diferencias geográficas estacionales y anuales (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Anexo), S18-S24, 1989). La mayoría de las enfermedades en países templados son debidas a cepas del serogrupo B y su incidencia varía desde 1-101100.000/población total al año, alcanzando a veces valores superiores (Kaczmarek, E. B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R. J. P. M., Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. y col., Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., y col., Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990).

Las epidemias dominadas por meningococos del serogrupo A, mayoritariamente en África central, se encuentra que a veces que alcanzan unos niveles de hasta 1. 000/100.000/año (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Anexo), S18-S24, 1989). Prácticamente todos los casos en total de las enfermedades meningocócicas son provocadas por meningococos de los serogrupos A, B, C, W-135 e Y, y hay disponible una vacuna de polisacáridos tetravalente A, C, W-135, Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982).

Las vacunas de polisacáridos se están mejorando actualmente mediante su conjugación química con proteínas portadoras (Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K. y col., JAMA 275: 1499-1503, 1996).

No hay disponible una vacuna para el serogrupo B, dado que se encontró que el polisacárido capsular B no era inmunógeno, muy probablemente porque comparte una similitud estructural con los componentes del hospedador (Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L. y col., J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Mäkelä, P. M., Lancet ii.: 355-357, 1983).

Durante muchos años se han iniciado y llevado a cabo esfuerzos para desarrollar vacunas basadas en la membrana externa meningocócica (de Moraes, J. C., Perkins, B., Camargo, M. C. y col., Lancet 340: 1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E. A. Gronnesby, J. K. y col., 338: 1093-1096, 1991). Dichas vacunas han demostrado unas eficacias del 57% - 85% en niños (>4 años) y adolescentes.

En estas vacunas hay presentes muchos componentes de la membrana externa bacteriana, tales como PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB, y la contribución observada de estos componentes a la protección todavía necesita una definición adicional. Se han definido otros componentes de la membrana externa usando anticuerpos animales o humanos que pueden ser potencialmente relevantes para la inducción de una inmunidad protectora, tales como TbpB y NspA (Martin, D., Cadieux, N., Hamel, J., Brodeux, B. R., J. Exp. Med. 185: 1173-1183, 1997; Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, p. y col., Inf. Immun. 63: 884-890, 1995). Los mecanismos de la inmunidad protectora implicarán una actividad bactericida mediada por anticuerpos y opsonofagocitosis.

Se ha usado un modelo animal de bacteriemia para combinar todos los mecanismos mediados por anticuerpos (Saukkonen, K., Leinonen, M., Abdillahi, H. Poolman, J. T., Vaccine 7: 325-328, 1989). Generalmente se acepta que el mecanismo bactericida mediado por el componente del complemento tardío es crucial para la inmunidad frente a una enfermedad meningocócica (Ross, S. C., Rosenthal P. J., Berberic, H. M., Densen, P. J., Infect. Dis. 155: 1266-1275, 1987).

En el documento WO99/57280 se desvelan varias proteínas de *Nesseria meningitidis*.

La frecuencia de las infecciones por *Neisseria meningitidis* se ha incrementado drásticamente en las pasadas décadas. Esto se ha atribuido a la aparición de múltiples cepas resistentes a antibióticos y a un incremento en la población de personas con sistemas inmunitarios debilitados. Ya no es excepcional aislar cepas de *Neisseria meningitidis* que son resistentes a algunos o todos los antibióticos estándar. Este fenómeno ha creado una necesidad médica y una demanda no satisfechas de nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de cribado de fármacos y pruebas diagnósticas para este organismo.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a BASB041, en particular a polipéptidos BASB041 y a polinucleótidos BASB041, a materiales recombinantes y a procedimientos para su producción. En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para usar dichos polipéptidos y polinucleótidos, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades microbianas, entre otros. En un aspecto adicional, la invención se refiere a ensayos diagnósticos para detectar enfermedades asociadas con infecciones microbianas y trastornos asociados con dichas infecciones, tales como ensayos para detectar la expresión o la actividad de los polinucleótidos o polipéptidos BASB041.

Descripción de la invención

La invención se refiere a polipéptidos y polinucleótidos BASB041, según se describe con mayor detalle a continuación. La invención se refiere especialmente a BASB041 con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos establecidas en las SEC ID N°: 1, 3, 5 y las SEC ID N°: 2, 4, 6 respectivamente. Se entiende que en las secuencias enumeradas en la Lista de Secuencias, más abajo, "ADN" representa una ejemplificación de una forma de realización de la invención, dado que los expertos habituales en la materia reconocerán que dichas secuencias pueden emplearse provechosamente en polinucleótidos en general, incluyendo ribopolinucleótidos.

Polipéptidos

En un aspecto de la invención se proporcionan polipéptidos de *Neisseria meningitidis* denominados en lo sucesivo "BASB041" y "polipéptidos BASB041", y composiciones que comprenden los mismos.

La presente invención prevé adicionalmente:

- (a) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 97%, muy preferiblemente de al menos el 97-99% o una identidad exacta, con la de las SEC ID N°: 2, 4, 6.
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de al menos el 97%, más preferiblemente de al menos el 97-99% o una identidad exacta, con la de las SEC ID N°: 1, 3, 5 sobre la longitud completa de las SEC ID N°: 1, 3, 5 respectivamente.
- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 97%, más preferiblemente de al menos el 97-99% o una identidad exacta, con las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 2, 4, 6;

Los polipéptidos BASB041 proporcionados en las SEC ID N°: 2, 4, 6 son los polipéptidos BASB041 de las cepas de *Neisseria meningitidis* ATCC 13090 y H44/76.

La invención también proporciona un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de las SEC ID N°: 2, 4 ó 6 en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de las SEC ID N°: 2, 4 ó 6 y que tiene la misma o prácticamente la misma actividad inmunógena que el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 2, 4, 6. Es decir, el fragmento (si fuera necesario cuando se acopla a un portador) es capaz de provocar una respuesta inmunitaria que reconozca el polipéptido de las SEC ID N°: 2, 4 ó 6. Dicho fragmento inmunógeno puede incluir, por ejemplo, el polipéptido BASB041 carente de una secuencia líder N-terminal, y/o un dominio transmembranal y/o un dominio de anclaje C terminal. En un aspecto preferido, el fragmento inmunógeno de BASB041 según la invención comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 85%, más preferiblemente una identidad de al menos el 90%, aún más preferiblemente una identidad de al menos el 95%, muy preferiblemente una identidad de al menos el 97-99%, con la de las SEC ID N°: 2, 4, 6 sobre la longitud completa de las SEC ID N°: 2, 4, 6.

Un fragmento es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es completamente la misma que parte, pero no toda, cualquier secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido de la invención. Como con los polipéptidos BASB041, los fragmentos pueden ser independientes o estar comprendidos en un polipéptido mayor del cual forman una parte o región, muy preferiblemente como una única región continua en un único polipéptido mayor.

Algunos fragmentos preferidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos de truncamiento con una porción de una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 2, 4, 6, tales como una serie continua de residuos que incluye una secuencia de aminoácidos amino y/o carboxilo terminal. También se prefieren las formas de degradación de los polipéptidos de la invención producidos mediante o en una célula hospedadora. Adicionalmente se prefieren los fragmentos caracterizados por atributos estructurales o funcionales tales como fragmentos que comprenden hélices alfa y regiones formadoras de hélices alfa, láminas beta y regiones formadoras de láminas beta, giros y regiones formadoras de giros, espirales y regiones formadoras de espirales, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones antipáticas alfa, regiones antipáticas beta, regiones flexibles, regiones formadoras de superficie, regiones de unión al sustrato y regiones de alto índice antigénico.

Algunos fragmentos preferidos adicionales incluyen un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 12, 18, 20, 26, o un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos truncados o delecionados de la secuencia de aminoácidos de

las SEC ID N°: 2, 4, 6, 12, 18, 20, 26.

Los fragmentos de los polipéptidos de la invención pueden emplearse para producir el correspondiente polipéptido completo mediante síntesis peptídica; por lo tanto, estos fragmentos pueden emplearse como intermedios para la producción de los polipéptidos completos de la invención.

- 5 Los polipéptidos, o los fragmentos inmunógenos, de la invención, pueden estar en forma de la proteína "madura" o pueden ser una parte de una proteína mayor tal como un precursor o una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia adicional de aminoácidos que contenga secuencias secretoras o líder, prosequencias, secuencias que ayudan a la purificación tales como residuos múltiples de histidina, o una secuencia adicional para la estabilidad durante la producción recombinante. Adicionalmente, también se considera la adición de un polipéptido exógeno o de una cola lipídica, o secuencias de polinucleótidos para incrementar el potencial inmunógeno de la molécula final.

- 15 En un aspecto, la invención se refiere a proteínas de fusión solubles modificadas genéticamente que comprenden un polipéptido de la presente invención, o un fragmento descrito en este documento, y varias porciones de las regiones constantes de cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas de varias subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Como inmunoglobulina se prefiere la parte constante de la cadena pesada de la IgG humana, particularmente la IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región de bisagra. En una forma de realización en particular, puede eliminarse la parte Fc simplemente mediante la incorporación de una secuencia de escisión que puede ser escindida con el factor de coagulación sanguíneo Xa.

- 20 Adicionalmente, esta invención se refiere a procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión mediante modificaciones genéticas, y al uso de las mismas para el cribado de fármacos, el diagnóstico y la terapia. Un aspecto adicional de la invención también se refiere a polinucleótidos que codifican para dichas proteínas de fusión. Algunos ejemplos de la tecnología de proteínas de fusión pueden encontrarse en las Solicitudes de Patente Internacional N° WO94/29458 y WO94/22914.

- 25 Las proteínas pueden conjugarse químicamente o expresarse como proteínas de fusión recombinantes permitiendo que se produzca un incremento en los niveles en un sistema de expresión en comparación con la proteína no fusionada. El compañero de fusión puede ayudar a proporcionar epítopos de linfocitos T cooperadores (compañero de fusión inmunológico), preferiblemente epítopos de linfocitos T cooperadores reconocidos por seres humanos, o ayudar a la expresión de la proteína (potenciador de la expresión) con un rendimiento mayor que la proteína recombinante natural. Preferiblemente, el compañero de fusión será tanto un compañero de fusión inmunológico como un compañero potenciador de la expresión.

- 30 Algunos compañeros de fusión incluyen la proteína D de *Haemophilus influenzae* y la proteína no estructural del virus de la gripe, NS1 (hemaglutinina). Otro compañero de fusión es la proteína conocida como LytA. Preferiblemente se usa la porción C terminal de la molécula. LytA deriva de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una amidasa de N-acetil-L-alanina, la LytA amidasa, (codificada por el gen lytA {Gene, 43 (1986), páginas 265-272}), una autolisina que degrada específicamente algunos enlaces del esqueleto de peptidoglucano. El dominio C terminal de la proteína LytA es responsable de la afinidad por la colina o por algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad se ha explotado para el desarrollo de plásmidos de *E. coli* que expresan C-LytA útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LytA en su amino terminal {Biotechnology: 10, (1992), páginas 795-798}. Es posible usar la porción repetitiva de la molécula de LytA que se halla en el extremo C terminal partiendo del residuo 178, por ejemplo, los residuos 188 - 305.

- 35 En este documento también se describen variantes de los polipéptidos mencionados anteriormente, esto es, polipéptidos que varían de los referentes en sustituciones conservadoras de aminoácidos, mediante las cuales se sustituye un residuo por otro con características similares. Algunas de dichas sustituciones típicas son entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lys y Arg; o los residuos aromáticos Phe y Tyr.

- 40 Los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Dichos polipéptidos incluyen polipéptidos naturales aislados, polipéptidos producidos recombinantemente, polipéptidos producidos sintéticamente o polipéptidos producidos mediante una combinación de estos procedimientos. Los medios para preparar dichos polipéptidos son bien comprendidos en la materia.

Es muy preferido que un polipéptido de la invención derive de *Neisseria meningitidis*, sin embargo, preferiblemente puede obtenerse a partir de otros organismos del mismo género taxonómico. Un polipéptido de la invención también puede obtenerse, por ejemplo, a partir de organismos de la misma familia u orden taxonómico.

Polinucleótidos

Es un objeto de la invención proporcionar polinucleótidos que codifican para polipéptidos BASB041, particularmente polinucleótidos que codifican para el polipéptido denominado en este documento BASB041.

- 5 En una forma particularmente preferida de la invención, el polinucleótido comprende una región que codifica para polipéptidos BASB041 que comprende una secuencia establecida en las SEC ID N°: 1, 3, 5 que incluye un gen completo.

Los polinucleótidos BASB041 proporcionados en las SEC ID N°: 1, 3 y 5 son los polinucleótidos BASB041 de las cepas de *Neisseria meningitidis* ATCC 13090 y H44/76.

- 10 Como un aspecto adicional de la invención, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos aislados que codifican y/o expresan polipéptidos y polinucleótidos BASB041, particularmente polipéptidos y polinucleótidos BASB041 de *Neisseria meningitidis*, incluyendo, por ejemplo, ARN no procesados, ARN de ribozima, ARNm, ADNc, ADN genómicos, bandas de Z-ADN. Algunas formas de realización adicionales de la invención incluyen polinucleótidos y polipéptidos biológica, diagnóstica, profiláctica, clínica o terapéuticamente útiles, y composiciones que comprenden los mismos.

- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a polinucleótidos aislados, que incluyen al menos un gen completo, que codifica para un polipéptido BASB041 con una secuencia de aminoácidos deducida de las SEC ID N°: 2, 4, 6.

En otra forma de realización particularmente preferida de la invención hay un polipéptido BASB041 de *Neisseria meningitidis* que comprende o está que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 2, 4, 6.

- 20 Usando la información proporcionada en este documento, tal como una secuencia de polinucleótido establecida en las SEC ID N°: 1, 3, 5, puede obtenerse un polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido BASB041 usando procedimientos estándar de clonación y cribado, tales como los usados para la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN cromosómico a partir de bacterias usando células de *Neisseria meningitidis* como material de partida, seguido de la obtención de un clon completo. Por ejemplo, para obtener una secuencia de polinucleótido de la invención, tal como la secuencia de polinucleótido proporcionada en las SEC ID N°: 1, 3, 5, típicamente se sondea una genoteca de clones de ADN cromosómico de *Neisseria meningitidis* en *E. coli* o cualquier otro hospedador adecuado con oligonucleótidos radiomarcados, preferiblemente uno de 17-mer o mayor, derivado a partir de una secuencia parcial. Los clones portadores de un ADN idéntico al de la sonda podrán distinguirse entonces usando unas condiciones de hibridación rigurosas. Mediante la secuenciación de los clones individuales así identificados mediante hibridación con cebadores de secuenciación diseñados a partir de la secuencia del polipéptido o polinucleótido original, es posible entonces extender la secuencia de polinucleótido en ambas direcciones para obtener una secuencia génica completa. Convenientemente, dicha secuenciación se realiza, por ejemplo, usando ADN bicatenario desnaturalizado preparado a partir de un clon de plásmido. Las técnicas adecuadas se describen en Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook y col., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). (véase, en particular, Cribado Mediante Hibridación 1.90 y Secuenciación De Moldes De ADN Bicatenario Desnaturalizado 13.70). La secuenciación directa de ADN genómico también puede realizarse para obtener una secuencia completa de un gen. Ilustrativo de la invención, cada polinucleótido establecido en las SEC ID N°: 1, 3, 5, fue descubierto en una genoteca de ADN derivado de *Neisseria meningitidis*.

- 40 Además, cada secuencia de ADN establecida en las SEC ID N°: 1, 3, 5 contiene un marco abierto de lectura que codifica para una proteína con aproximadamente el número de residuos de aminoácidos establecidos en las SEC ID N°: 2, 4, 6, con un peso molecular deducido que puede calcularse usando los valores de pesos moleculares de los residuos de aminoácidos bien conocidos por los expertos en la materia.

- 45 El polinucleótido de la SEC ID N°: 1, entre el codón de inicio en el nucleótido número 1 y el codón de detención que comienza en el nucleótido número 669 de la SEC ID N°: 1, codifica para el polipéptido de la SEC ID N°: 2. El polinucleótido de la SEC ID N°: 3, entre el codón de inicio en el nucleótido número 1 y el codón de detención que comienza en el nucleótido número 670 de la SEC ID N°: 3, codifica para el polipéptido de la SEC ID N°: 4.

El polinucleótido de la SEC ID N°: 5, entre el primer codón de inicio en el nucleótido número 1 y el codón de detención que comienza en el nucleótido número 670 de la SEC ID N°: 5, codifica para el polipéptido de la SEC ID N°: 6.

- 50 En un aspecto adicional, la presente invención prevé un polinucleótido aislado que comprende o está que consiste en:

- (a) una secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de al menos el 97%, más preferiblemente de al menos el 97-99% o una identidad exacta, con la de las SEC ID N°: 1, 3, 5 sobre la longitud completa de las SEC ID N°: 1, 3, 5 respectivamente; o
- 55 (b) una secuencia de polinucleótidos que codifica para un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 97%, más preferiblemente de al menos el 97-99% o 100% exacta, con la secuencia de aminoácidos de las

SEC ID N°: 2, 4, 6 sobre la longitud completa de las SEC ID N°: 2, 4, 6 respectivamente.

Puede obtenerse un polinucleótido que codifica para un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos y ortólogos de especies distintas a *Neisseria meningitidis*, mediante un procedimiento que comprende las etapas de cribar una genoteca apropiada en unas condiciones de hibridación rigurosas (por ejemplo, usando una temperatura en el intervalo de 45 - 65°C y una concentración de SDS de 0,1-1%) con una sonda marcada o detectable consistente o formada por las secuencias de las SEC ID N°: 1, 3, 5 o un fragmento de las mismas; y aislar un gen completo y/o clones genómicos que contienen dichas secuencia del polinucleótido.

La invención proporciona una secuencia de polinucleótido idéntica en su longitud completa a una secuencia codificante (marco abierto de lectura) de las SEC ID N°: 1, 3, 5. La invención también proporciona una secuencia codificante para un polipéptido maduro o un fragmento del mismo, por sí misma así como una secuencia codificante para un polipéptido maduro o un fragmento o en marco de lectura con otra secuencia codificante, tal como una secuencia que codifica para una secuencia líder o secretora, una secuencia de pre, o pro- o preproproteína. El polinucleótido de la invención también puede contener al menos una secuencia no codificante, incluyendo, por ejemplo, pero no limitada a, al menos una secuencia no codificante 5' y 3', tal como las secuencias transcritas pero no traducidas, señales de terminación (tales como señales de terminación rho-dependientes y rho-independientes), sitios de unión a ribosomas, secuencias de Kozak, secuencias que estabilizan el ARNm, intrones y señales de poliadenilación. La secuencia de polinucleótido también puede comprender una secuencia codificante adicional que codifica para aminoácidos adicionales. Por ejemplo, puede estar codificada una secuencia marcadora que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En algunas formas de realización de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexahistidina, según se prevé en el vector pQE (Qiagen, Inc.) y se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU. 86: 821-824 (1989), o una etiqueta peptídica HA (Wilson y col., Cell 37: 767 (1984), ambos de los cuales pueden ser útiles en la purificación de la secuencia del polipéptido fusionado a ellos. Los polinucleótidos de la invención también incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos que comprenden un gen estructural y sus secuencias asociadas naturalmente que controlan la expresión génica.

La secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido BASB041 de las SEC ID N°: 2, 4, 6 puede ser idéntica a la secuencia codificante del polipéptido contenida en los nucleótidos 1 a 668 de la SEC ID N°: 1, la secuencia codificante del polipéptido contenida en los nucleótidos 1 a 669 de la SEC ID N°: 3, o la secuencia codificante del polipéptido contenida en los nucleótidos 1 a 669 de la SEC ID N°: 5, respectivamente. Alternativamente puede ser una secuencia, que como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, también codifique para el polipéptido de las SEC ID N°: 2, 4, 6.

El término "polinucleótido que codifica para un polipéptido" según se usa en este documento engloba a polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica para un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido bacteriano, y más particularmente un polipéptido BASB041 de *Neisseria meningitidis* con una secuencia de aminoácidos establecida en las SEC ID N°: 2, 4, 6. El término también engloba a polinucleótidos que incluyen una única región continua o regiones discontinuas que codifican para el polipéptido (por ejemplo, polinucleótidos interrumpidos por un fago integrado, una secuencia de inserción integrada, una secuencia de un vector integrada, una secuencia de un transposón integrada, o debido a la corrección del ARN o a la reorganización del ADN genómico), junto con regiones adicionales, que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

Se describen variantes de los polinucleótidos descritos en este documento que codifican para variantes de un polipéptido con una secuencia deducida de aminoácidos de las SEC ID N°: 2, 4, 6. Pueden usarse, por ejemplo, fragmentos de polinucleótidos de la invención, para sintetizar polinucleótidos completos de la invención.

También se describen en este documento polinucleótidos que codifican para variantes de BASB041, que tienen la secuencia de aminoácidos del polipéptido BASB041 de las SEC ID N°: 2, 4, 6, en la que muchos, unos pocos, de 5 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2, 1 o ningún residuo de aminoácido ha sido sustituido, modificado, deletado, y/o añadido, en cualquier combinación. De entre estas son preferibles las sustituciones, adiciones y delecciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades del polipéptido BASB041.

Algunas formas de realización preferidas adicionales de la invención son polinucleótidos que son idénticos en al menos un 97% sobre su longitud completa a un polinucleótido que codifica para el polipéptido BASB041 con una secuencia de aminoácidos establecida en las SEC ID N°: 2, 4, 6, y polinucleótidos que son complementarios de dichos polinucleótidos. Adicionalmente, de entre estos son particularmente altamente preferidos aquellos con al menos el 98% y al menos el 99%, siendo los más preferidos con al menos el 99%.

Las formas de realización preferidas son polinucleótidos que codifican para polipéptidos que conservan sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por un ADN de las SEC ID N°: 1, 3, 5.

En este documento también se describen polinucleótidos que hibridan, particularmente en condiciones rigurosas, con las secuencias del polinucleótido BASB041, tales como los polinucleótidos de las SEC ID N°: 1, 3, 5.

También se describen polinucleótidos que hibridan con las secuencias de polinucleótido proporcionadas en este

documento. A este respecto, la invención se refiere especialmente a polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos descritos en este documento. Según se usa en este documento, los términos "condiciones rigurosas" y "condiciones de hibridación rigurosas" significan que la hibridación sólo se produce si hay una identidad de al menos el 95% y preferiblemente al menos el 97% entre las secuencias. Un ejemplo específico de condición de hibridación rigurosa es una incubación hasta el día siguiente a 42°C en una disolución que comprende: formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 150mM, citrato trisódico ism), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, seguido de un lavado del soporte de hibridación con 0,1x SSC a aproximadamente 65°C. Las condiciones de hibridación y de lavado son bien conocidas y están ejemplificadas en Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), particularmente en el capítulo 11 del mismo. La disolución de hibridación también puede usarse con las secuencias de polinucleótido proporcionadas por la invención.

En este documento también se describe un polinucleótido consistente en o que consiste en una secuencia de polinucleótido obtenida mediante el cribado de una genoteca apropiada que contiene el gen completo para una secuencia de polinucleótidos establecida en las SEC ID N°: 1, 3, 5, en unas condiciones de hibridación rigurosas con una sonda que tiene la secuencia de dicha secuencia de polinucleótidos establecida en las SEC ID N°: 1, 3, 5, o un fragmento de la misma; y aislar dicha secuencia de polinucleótidos. Los fragmentos útiles para obtener dicho polinucleótido incluyen, por ejemplo, sondas y cebadores completamente descritos en otras partes de este documento.

Según se discute en otras partes de este documento en relación con los ensayos del polinucleótido de la invención, por ejemplo, los polinucleótidos de la invención pueden usarse como una sonda de hibridación para ARN, ADNc y ADN genómico para aislar ADNc completos y clones genómicos que codifican para BASB041, y para aislar ADNc y clones genómicos de otros genes que tienen una alta identidad, particularmente una alta identidad de secuencia, con el gen BASB041. Dichas sondas comprenderán generalmente al menos 15 residuos de nucleótidos o pares de bases. Preferiblemente, dichas sondas tendrán al menos 30 residuos de nucleótidos o pares de bases, y pueden tener al menos 50 residuos de nucleótidos o pares de bases. Las sondas particularmente preferidas tendrán al menos 20 residuos de nucleótidos o pares de bases, y tendrán menos de 30 residuos de nucleótidos o pares de bases.

Puede aislarse una región codificante de un gen BASB041 mediante cribado usando una secuencia de ADN proporcionada en las SEC ID N°: 1, 3, 5 para sintetizar una sonda oligonucleotídica. Entonces se usa un oligonucleótido marcado con una secuencia complementaria a la del gen de la invención para cribar una genoteca de ADNc, ADN genómico o ARNm para determinar con qué miembros de la genoteca hibrida la sonda.

Hay disponibles varios procedimientos y son bien conocidos por los expertos en la materia para obtener ADN completos, o ADN cortos extendidos, por ejemplo, los basados en el procedimiento de amplificación rápida de extremos de ADNc (*Rapid Amplification of cDNA ends, RACE*) (véase, por ejemplo, Frohman, y col., PNAS EE.UU. 85: 8998-9002, 1988). Recientes modificaciones de la técnica, ejemplificadas por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.), por ejemplo, han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos. Con la tecnología Marathon™ se han preparado ADNc a partir de ARNm extraído de un tejido seleccionado y una secuencia 'adaptadora' ligada en cada extremo. Entonces se lleva a cabo una amplificación de ácidos nucleicos (PCR) para amplificar el extremo 5' "ausente" del ADN usando una combinación de cebadores oligonucleotídicos específicos del gen y específicos del adaptador. Entonces se repite la reacción de PCR usando cebadores "añadidos", esto es, cebadores diseñados para aparearse con el producto amplificado (típicamente un cebador específico del adaptador que se aparea más allá de 3' en la secuencia adaptadora y un cebador específico del gen que se aparea más allá de 5' en la secuencia del gen seleccionado). Entonces los productos de esta reacción pueden analizarse mediante secuenciación del ADN y construir un ADN completo bien uniendo el producto directamente al ADN existente para dar una secuencia completa, o bien llevando a cabo una PCR completa por separado usando la información de la nueva secuencia para el diseño del cebador 5'.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden emplearse, por ejemplo, como reactivos y materiales de investigación para el descubrimiento de tratamientos y diagnósticos de enfermedades, particularmente enfermedades humanas, como se discutirá adicionalmente en este documento en relación con los ensayos de polinucleótidos.

Los polinucleótidos de la invención que son oligonucleótidos derivados de una secuencia de las SEC ID N°: 1, 3 ó 5 pueden usarse en el procedimiento de este documento según se describe, pero preferiblemente para una PCR, para determinar si los polinucleótidos identificados en este documento son o no, en todo o en parte, transcritos en bacterias de tejido infectado. Se reconoce que dichas secuencias también tendrán utilidad en el diagnóstico de la etapa de infección y el tipo de infección que ha alcanzado el patógeno.

La invención también proporciona polinucleótidos que codifican para un polipéptido que es la proteína madura más aminoácidos amino o carboxilo terminales adicionales, o aminoácidos interiores del polipéptido maduro (cuando la forma madura tiene más de una cadena polipeptídica, por ejemplo). Dichas secuencias pueden tener un papel en el procesado de una proteína a partir de un precursor hasta una forma madura, pueden permitir el transporte proteico,

pueden alargar o acortar la semivida proteica o pueden facilitar la manipulación de una proteína para su ensayo o producción, entre otras cosas. Como generalmente es el caso *in vivo*, los aminoácidos adicionales pueden eliminarse de la proteína madura mediante enzimas celulares.

5 Para todos y cada uno los polinucleótidos de la invención se proporciona un polinucleótido complementario. Se prefiere que estos polinucleótidos complementarios sean totalmente complementarios de cada polinucleótido con el que son complementarios.

10 Una proteína precursora, con una forma madura del polipéptido fusionada a una o más prosequencias, puede ser una forma inactiva del polipéptido. Generalmente, cuando se eliminan las prosequencias, dichos precursores inactivos se activan. Pueden eliminarse algunas o todas las prosequencias antes de la activación. Generalmente, dichos precursores se denominan proproteínas.

15 Además de las representaciones estándar A, G, C, T/U de los nucleótidos, también puede usarse el "N" para describir algunos polinucleótidos de la invención. "N" significa que puede aparecer cualquiera de los cuatro nucleótidos del ADN o el ARN en dicha posición designada en la secuencia de ADN o ARN, excepto porque se prefiere que N no sea un ácido nucleico tal que cuando se toma en combinación con posiciones de nucleótidos adyacentes, cuando se lee en el marco de lectura correcto, tenga el efecto de generar un codón de terminación prematuro en dicho marco de lectura.

20 En resumen, un polinucleótido de la invención puede codificar para una proteína madura, una proteína madura más una secuencia líder (que puede ser denominada como preproteína), un precursor de una proteína madura con una o más prosequencias que no son las secuencias líder de una preproteína, o una preproteína que es un precursor de una proproteína, o una preproteína que es un precursor de una proproteína, con una secuencia líder y una o más prosequencias, que generalmente se eliminan durante las etapas de procesamiento que producen formas activas y maduras del polipéptido.

Según un aspecto de la invención, se proporciona el uso de un polinucleótido de la invención con propósitos terapéuticos o profilácticos, en particular una inmunización genética.

25 El uso de un polinucleótido de la invención en una inmunización genética empleará preferiblemente un procedimiento de administración adecuado, tal como la inyección directa de un ADN de plásmido en los músculos (Wolff y col., Hum Mol Genet (1992) 1: 363, Manthorpe y col., Hum. Gene Ther. (1983) 4: 419), la administración de ADN complejado con portadores proteicos específicos (Wu y col., J Biol Chem. (1989) 264: 16985), la coprecipitación de ADN con fosfato cálcico (Benvenisty & Reshef, PNAS EE.UU., (1986) 83: 9551), la encapsulación de ADN en varias formas de liposomas (Kaneda y col., Science (1989) 243: 375), el bombardeo con partículas (Tang y col., Nature (1992) 356: 152, Eisenbraun y col., DNA Cell Biol (1993) 12: 791) y la infección *in vivo* usando vectores retrovíricos clonados (Seeger y col., PNAS EE.UU. (1984) 81: 5849).

Vectores, Células Hospedadoras, Sistemas de Expresión

35 La invención también se refiere a vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la invención, a células hospedadoras que están modificadas genéticamente con vectores de la invención y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes. También pueden emplearse sistemas de traducción acelulares para producir dichas proteínas usando derivados de ARN de los constructos de ADN de la invención.

40 Los polipéptidos recombinantes de la presente invención pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia a partir de células hospedadoras modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. Consecuentemente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención, a células hospedadoras que están modificadas genéticamente con dichos sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes.

45 Para la producción recombinante de los polipéptidos de la invención pueden modificarse genéticamente células hospedadoras para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos, o polinucleótidos de la invención. La introducción de un polinucleótido en la célula hospedadora puede efectuarse mediante los procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis, y col., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook, y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), tales como transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, raspado de la membrana celular ("*scrape loading*"), introducción balística e infección.

55 Algunos ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de estreptococos, estafilococos, enterococos, *E. coli*, Streptomyces, cianobacterias y *Bacillus subtilis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*; células fúngicas, tales como células de una levadura *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, un basidiomiceto, *Candida albicans* y *Aspergillus*; células de insectos, tales como células de *Drosophila* S2 y de *Spodoptera* Sf9; células animales, tales como células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 y células de melanoma de Bowes; y células vegetales, tales como células de una gimnosperma o

una angiosperma.

Se puede usar una gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. Dichos vectores incluyen, entre otros, vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos de cromosomas de levaduras, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tales como el SV40, el virus de la variolovacuna, adenovirus, el virus de la viruela aviar, el virus de la pseudorrabia, picornavirus, retrovirus y alfavirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagómidos. Los constructos del sistema de expresión pueden contener regiones de control que regulen, así como que generen, la expresión. Generalmente, puede usarse cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o para expresar un polipéptido en un hospedador para su expresión a este respecto. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el sistema de expresión mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas y rutinarias, tales como, por ejemplo, las establecidas en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, (*supra*).

En los sistemas de expresión recombinante en eucariotas, para la secreción de una proteína traducida en la luz del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas del polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos de la presente invención pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante procedimientos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacciones hidrófobas, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina. Muy preferiblemente, se emplea cromatografía de afinidad por ion metálico (*ion metal affinity chromatography*, IMAC) para la purificación. Pueden emplearse técnicas bien conocidas para replegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante la síntesis, el aislamiento y/o la purificación intracelular.

La invención también proporciona un procedimiento de purificación de (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (ii) un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (iii) un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno, en el que dicho procedimiento se elige del grupo que consiste en precipitación con sulfato amónico, precipitación con etanol, extracción ácida, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacciones hidrófobas, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina.

La invención también proporciona un procedimiento para producir una composición de vacuna que comprende (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (ii) un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (iii) un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno, en el que dicho procedimiento comprende el procedimiento anterior de purificación y además comprende la etapa de formular dicho polipéptido o fragmento inmunógeno con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El sistema de expresión también puede ser un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o una bacteria. El gen de interés puede insertarse en el genoma de un virus o bacteria recombinante vivo. La inoculación y la infección *in vivo* con este vector vivo, dará lugar a la expresión *in vivo* del antígeno y a la inducción de respuestas inmunitarias. Los virus y bacterias usados para este fin son, por ejemplo: poxvirus (por ejemplo, vaccinia, de viruela aviar, de viruela del canario), alfavirus (virus de Sindbis, virus del bosque de Semliki, virus de encefalitis equina venezolana), adenovirus, virus adenoasociados, picornavirus (poliovirus, rinovirus), herpesvirus (virus de varicela zóster, etc), Listeria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BCG. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos o estar atenuados de diversas formas con objeto de obtener vacunas vivas. Dichas vacunas vivas también forman parte de la invención.

Ensayos de Diagnóstico, Pronóstico, Serotipado y Mutación

La presente invención se refiere también al uso de polinucleótidos y polipéptidos BASB041 de la invención para su uso como reactivos de diagnóstico. La detección de polinucleótidos y/o polipéptidos BASB041 en un eucariota, particularmente en un mamífero, y especialmente en un ser humano, proporcionará un procedimiento de diagnóstico para el diagnóstico de la enfermedad, la estadificación de la enfermedad o la respuesta a los fármacos de un

organismo infeccioso. Los eucariotas, particularmente los mamíferos, y especialmente los seres humanos, particularmente aquellos infectados o sospechosos de estar infectados por un organismo que comprende el gen o la proteína BASB041, pueden detectarse a nivel de ácidos nucleicos o de aminoácidos mediante varias técnicas bien conocidas, así como mediante los procedimientos proporcionados en este documento.

- 5 Los polipéptidos y polinucleótidos para el pronóstico, el diagnóstico u otro análisis pueden obtenerse a partir de materiales corporales de individuos posiblemente infectados y/o infectados. Los polinucleótidos de cualquiera de estas fuentes, particularmente de ADN o ARN, pueden usarse directamente para la detección o pueden amplificarse enzimáticamente usando PCR o cualquier otra técnica de amplificación antes del análisis. También puede usarse de la misma forma ARN, particularmente ARNm, ADNc y ADN genómico. Usando la amplificación, puede realizarse la
- 10 caracterización de la especie y la cepa de un organismo infeccioso o residente presente en un individuo mediante un análisis del genotipo de un polinucleótido seleccionado del organismo. Las delecciones e inserciones pueden detectarse mediante un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo de una secuencia de referencia seleccionada a partir de un organismo relacionado, preferiblemente una especie diferente del mismo género o una cepa diferente de la misma especie. Las mutaciones puntuales pueden identificarse
- 15 hibridando ADN amplificado con secuencias de polinucleótidos BASB041 marcadas. Las secuencias con una correspondencia perfecta o significativa pueden distinguirse de las parejas con correspondencia imperfecta o menos significativa mediante digestión con ADNasa o ARNasa, mediante ADN o ARN respectivamente, o detectando las diferencias en las temperaturas de fusión o la cinética de renaturalización. Las diferencias en las secuencias de polinucleótidos también pueden detectarse mediante alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de
- 20 polinucleótidos en geles en comparación con una secuencia de referencia. Esto puede llevarse a cabo con o sin agentes de desnaturalización. Las diferencias de polinucleótidos pueden detectarse también mediante secuenciación directa de ADN o ARN. Véase, por ejemplo, Myers y col., Science, 230: 1242 (1985). Los cambios de la secuencia en ubicaciones específicas pueden revelarse también mediante ensayos de protección de nucleasa, tales como ensayos de protección de ARNasa, V1 y S1, o un procedimiento de escisión química. Véase por ejemplo,
- 25 Cotton y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 85: 4397-4401 (1985).

En otra forma de realización, puede construirse una matriz de sondas oligonucleotídicas que comprende una secuencia de nucleótidos BASB041 o fragmentos de la misma, para realizar un cribado eficaz de, por ejemplo, mutaciones genéticas, serotipo, clasificación o identificación taxonómica. Los procedimientos con tecnologías de

30 matrices son bien conocidos y tienen una aplicabilidad general, y pueden usarse para responder a varias preguntas sobre genética molecular, incluyendo expresión génica, unión genética y variabilidad genética (véase, por ejemplo, Chee y col., Science, 274: 610 (1996)).

También se describe en este documento un kit de diagnóstico que comprende:

- (a) un polinucleótido de la presente invención, preferiblemente la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 1, 3, 5, o un fragmento de la misma;
- 35 (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la de (a);
- (c) un polipéptido de la presente invención, preferiblemente el polipéptido de las SEC ID N°: 2, 4, 6, o un fragmento del mismo; o
- (d) un anticuerpo para un polipéptido de la presente invención, preferiblemente para el polipéptido de las SEC ID N°: 2, 4, 6.
- 40 Se apreciará que en cualquier kit de este tipo, (a), (b), (c) o (d) puede comprender un componente sustancial. Dicho kit tendrá uso en el diagnóstico de una enfermedad o en la susceptibilidad a una enfermedad, entre otros.

Esta invención también se refiere al uso de polinucleótidos de la presente invención como reactivos de diagnóstico. La detección de una forma mutada de un polinucleótido de la invención, preferible las SEC ID N°: 1, 3, 5, que está asociada con una enfermedad o patogenicidad, proporcionará una herramienta diagnóstica que puede añadirse a, o

45 definir, un diagnóstico de una enfermedad, un pronóstico del curso de enfermedad, una determinación de una fase de la enfermedad o una susceptibilidad a una enfermedad, lo que resulta de la subexpresión, sobreexpresión o expresión alterada del polinucleótido. Los organismos, particularmente los organismos infecciosos, portadores de mutaciones en dicho polinucleótido, pueden detectarse a nivel de polinucleótido mediante diversas técnicas, tales como las descritas en otras partes del presente documento.

- 50 Las células de un organismo portador de mutaciones o polimorfismos (variaciones alélicas) en un polinucleótido y/o un polipéptido de la invención pueden detectarse también a nivel de polinucleótidos o de polipéptidos mediante diversas técnicas, para permitir, por ejemplo, el serotipado. Por ejemplo, puede usarse una RT-PCR para detectar mutaciones en el ARN. Particularmente, se prefiere usar una RT-PCR junto con sistemas de detección automatizados, como, por ejemplo, GeneScan. También pueden usarse para el mismo propósito, una PCR, ARN,
- 55 ADNc o ADN genómico. Como ejemplo, pueden usarse cebadores de PCR complementarios de un polinucleótido que codifica para el polipéptido BASB041 para identificar y analizar mutaciones.

También se describen en este documento cebadores con 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3'. Estos cebadores pueden usarse para, entre otras cosas, amplificar ADN y/o ARN de BASB041 aislados a partir de una muestra obtenida de un individuo, como un material corporal. Los cebadores pueden usarse para amplificar un

polinucleótido aislado a partir de un individuo infectado, de forma que el polinucleótido pueda someterse entonces a diversas técnicas para la elucidación de la secuencia de polinucleótidos. De esta forma pueden detectarse mutaciones en las secuencias de polinucleótidos y usarse para diagnosticar y/o pronosticar la infección o su fase o curso, o para serotipar y/o clasificar el agente infeccioso.

- 5 La invención proporciona además un procedimiento para diagnosticar una enfermedad, preferiblemente infecciones bacterianas, más preferiblemente infecciones causadas por *Neisseria meningitidis*, que comprende la determinación a partir de una muestra obtenida de un individuo, tal como un material corporal, de un nivel aumentado de expresión del polinucleótido que tiene una secuencia de las SEC ID N°: 1, 3, 5. La expresión aumentada o disminuida de un polinucleótido BASB041 puede medirse usando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la materia para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, amplificación, PCR, RT-PCR, protección de ARNasa, inmunotransferencia Northern, espectrometría y otros procedimientos de hibridación.

- 10 Además, puede usarse un ensayo de diagnóstico según la invención para detectar la sobreexpresión del polipéptido BASB041 en comparación con muestras de tejido de control normal, para detectar la presencia de una infección, por ejemplo. Las técnicas de ensayo que pueden usarse para determinar niveles del polipéptido BASB041, en una muestra obtenida de un hospedador, tal como un material corporal, son bien conocidas por los expertos en la materia. Dichos procedimientos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis mediante inmunotransferencia Western, ensayos en sándwich de anticuerpos, detección de anticuerpos y ensayos ELISA.

- 20 Los polinucleótidos de la invención pueden usarse como componentes de matrices polinucleotídicas, preferentemente matrices o retículas de alta densidad. Estas matrices de alta densidad son particularmente útiles con fines de diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, puede usarse un conjunto de puntos que comprenden cada uno un gen diferente, y que comprenden además un polinucleótido o polinucleótidos de la invención, como sondas, tal como usando hibridación o amplificación de ácidos nucleicos, usando una sonda obtenida o derivada de una muestra corporal, para determinar la presencia de una secuencia de polinucleótidos en particular o de una secuencia relacionada en un individuo. Dicha presencia puede indicar la presencia de un patógeno, en particular *Neisseria meningitidis*, y puede ser útil en el diagnóstico y/o el pronóstico de una enfermedad o del curso de una enfermedad. Se prefiere una retícula que comprenda una serie de variantes de las secuencias de polinucleótidos de las SEC ID N°: 1, 3, 5. También se prefiere una retícula que comprenda varias variantes de secuencias de polinucleótidos que codifican para la secuencia de polipéptidos de las SEC ID N°: 2, 4, 6.

30 **Anticuerpos**

Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención o variantes de los mismos, o las células que expresan los mismos, pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos inmunoespecíficos para dichos polipéptidos o polinucleótidos, respectivamente.

También se describen en este documento anticuerpos contra polipéptidos o polinucleótidos BASB041.

- 35 Pueden obtenerse anticuerpos generados contra los polipéptidos o polinucleótidos de la invención mediante la administración de los polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención, o fragmentos portadores de epítopos de uno o ambos, análogos de uno o ambos, o células que expresan uno o ambos, a un animal, preferiblemente no humano, usando protocolos rutinarios. Para la preparación de anticuerpos monoclonales puede usarse cualquier técnica conocida en la materia que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Algunos ejemplos incluyen diversas técnicas, como las de Kohler, G. y Milstein, C., Nature 256: 495 - 497 (1975); Kozbor y col., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole y col., págs. 77 - 96 en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. (1985).

- 45 Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EE.UU. nº 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios contra polipéptidos o polinucleótidos de esta invención. También pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos o animales, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados inmunoespecíficos de los polipéptidos o polinucleótidos de la invención.

- 50 Alternativamente, puede utilizarse tecnología de presentación de fagos para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión hacia un polipéptido de la invención, ya sea a partir de repertorios de genes v amplificados mediante PCR de linfocitos de seres humanos cribados selectivamente por poseer anti-BASB041, o a partir de genotecas nuevas (McCafferty, y col., (1990), Nature 348, 552 - 554; Marks, y col., (1992) Biotechnology 10, 779 - 783). La afinidad de estos anticuerpos también puede mejorarse, por ejemplo, mediante transposiciones de cadena (Clackson y col., (1991) Nature 352: 628).

- 55 Los anticuerpos descritos anteriormente pueden emplearse para aislar o para identificar clones que expresan los polipéptidos o polinucleótidos de la invención para purificar los polipéptidos o polinucleótidos mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

Así, entre otros, pueden emplearse anticuerpos contra el polipéptido BASB041 o el polinucleótido BASB041 para tratar infecciones, en particular infecciones bacterianas.

Las variantes de polipéptido incluyen variantes antigénica, epitópica o inmunológicamente equivalentes que forman un aspecto particular de esta invención.

- 5 Preferiblemente, el anticuerpo o variante del mismo se modifica para hacerlo menos inmunógeno en el individuo. Por ejemplo, si el individuo es humano, el anticuerpo puede muy preferiblemente "humanizarse", en el que la región o regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de hibridoma se han trasplantado a un anticuerpo monoclonal humano, por ejemplo, según se describe en Jones y col. (1986), Nature 321: 522 - 525 o Tempest y col., (1991) Biotechnology 9, 266 - 273.

Antagonistas y Agonistas: ensayos y moléculas

- 10 Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención también pueden usarse para evaluar la unión de sustratos y ligandos de moléculas pequeñas como, por ejemplo, células, preparados acelulares, bibliotecas químicas y mezclas de productos naturales. Estos sustratos y ligandos pueden ser sustratos y ligandos naturales o pueden ser miméticos estructurales o funcionales. Véase por ejemplo, Coligan y col., Current Protocols in Immunology 1 (2): capítulo 5 (1991).

- 15 Los procedimientos de cribado pueden simplemente medir la unión de un compuesto candidato al polipéptido o polinucleótido, o a células o membranas portadoras del polipéptido o polinucleótido, o a una proteína de fusión del polipéptido mediante una etiqueta asociada directa o indirectamente con el compuesto candidato. Alternativamente, el procedimiento de cribado puede implicar la competencia con un competidor marcado. Además, estos procedimientos de cribado pueden probar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por activación o inhibición del polipéptido o polinucleótido, usando sistemas de detección apropiados para las células que comprenden el polipéptido o polinucleótido. Generalmente, los inhibidores de activación se ensayan en presencia de un agonista conocido y se observa el efecto sobre la activación por el agonista mediante la presencia del compuesto candidato. Pueden emplearse polipéptidos constitutivamente activos y/o polipéptidos y polinucleótidos expresados constitutivamente en los procedimientos de cribado para agonistas inversos o inhibidores, en ausencia de un agonista o inhibidor, probando si el compuesto candidato da como resultado la inhibición de la activación del polipéptido o polinucleótido, según el caso. Además, los procedimientos de cribado pueden comprender simplemente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una disolución que contiene un polipéptido o polinucleótido de la presente invención, para formar una mezcla, midiendo la actividad de polipéptido y/o polinucleótido BASB041 en la mezcla, y comparando la actividad del polipéptido y/o polinucleótido BASB041 de la mezcla con un estándar. También pueden usarse proteínas de fusión, tales como las formadas a partir de la porción Fc y el polipéptido BASB041, según se ha descrito anteriormente en este documento, para ensayos de cribado de alto rendimiento para identificar antagonistas del polipéptido de la presente invención, así como de polipéptidos filogenéticamente y y/o funcionalmente relacionados (véase D. Bennett y col., J Mol Recognition, 8: 52-58 (1995); y K. Johanson y col., J Biol Chem, 270 (16): 9459-9471 (1995)).
- 30

- 35 Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen a, y/o interactúan con, un polipéptido de la presente invención también pueden usarse para configurar procedimientos de cribado para detectar el efecto de compuestos añadidos sobre la producción de ARNm y/o polipéptidos en células. Por ejemplo, puede construirse un ensayo ELISA para medir los niveles de polipéptido secretado o asociado a la célula usando anticuerpos monoclonales y policlonales mediante procedimientos estándar conocidos en la materia. Esto puede usarse para descubrir agentes que pueden inhibir o mejorar la producción de polipéptido (también denominado antagonista o agonista, respectivamente) a partir de células o tejidos manipulados adecuadamente.
- 40

- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a proteínas de fusión solubles modificadas genéticamente que comprenden un polipéptido o fragmento de la presente invención, y varias porciones de las regiones constantes de cadenas pesadas con ligeras de inmunoglobulinas de varias subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). La inmunoglobulina preferida es la parte constante de la cadena pesada de la IgG humana, particularmente la IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región de bisagra. En una forma de realización en particular, puede eliminarse la parte Fc simplemente mediante la incorporación de una secuencia de escisión que puede ser escindida con el factor de coagulación sanguíneo Xa. Adicionalmente, esta invención se refiere a procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión mediante modificaciones genéticas, y al uso de las mismas para el cribado de fármacos, el diagnóstico y la terapia. Un aspecto adicional de la invención también se refiere a polinucleótidos que codifican para dichas proteínas de fusión. Algunos ejemplos de la tecnología de proteínas de fusión pueden encontrarse en las Solicitudes de Patente Internacional N° WO94/29458 y WO94/22914.
- 45
- 50

- Cada una de las secuencias de polinucleótido proporcionadas en este documento puede usarse en el descubrimiento y desarrollo de compuestos antibacterianos. La proteína codificada, tras su expresión, puede usarse como un objetivo para el cribado de fármacos antibacterianos. Adicionalmente, pueden usarse las secuencias de polinucleótidos que codifican para las regiones amino terminal de la proteína codificada o Shine-Delgarno u otras secuencias facilitadoras de la traducción de los respectivos ARNm para construir secuencias antisentido para controlar la expresión de la secuencia codificante de interés.
- 55

La invención también proporciona el uso del polipéptido o polinucleótido para interferir con la interacción física inicial entre un patógeno o patógenos y un eucariota, preferiblemente un mamífero, hospedador responsable de las

secuelas de la infección. En particular, las moléculas de la invención pueden usarse: en la prevención de la adhesión de bacterias, en particular bacterias grampositivas y/o gramnegativas, a eucariotas, preferiblemente mamíferos, proteínas de la matriz extracelular en dispositivos implantados o a proteínas de la matriz extracelular en heridas; para bloquear el material de adhesión entre eucariotas, preferiblemente mamíferos, proteínas de la matriz extracelular y proteínas bacterianas BASB041 que median en la lesión tisular, y/o; para bloquear la progresión normal de la patogenia en infecciones iniciadas de una forma distinta a la implantación de dispositivos implantados o mediante otras técnicas quirúrgicas.

También se describen en este documento mimótopos del polipéptido de la invención. Un mimótopo es una secuencia peptídica lo suficientemente similar al péptido natural (secuencial o estructuralmente), de forma que es capaz de ser reconocida por los anticuerpos que reconocen al péptido natural; o es capaz de originar anticuerpos que reconozcan el péptido natural cuando se acopla a un portador adecuado.

Los mimótopos peptídicos pueden diseñarse para un propósito particular mediante la adición, delección o sustitución de los aminoácidos seleccionados. Por lo tanto, los péptidos pueden modificarse para el propósito de una de conjugación con un procesador proteico. Por ejemplo, puede ser deseable para algunos procedimientos de conjugación química incluir una cisteína terminal. Además, puede ser deseable para los péptidos conjugados con un portador proteico incluir un terminal hidrófobo alejado del terminal conjugado del péptido, de forma que el extremo no conjugado libre del péptido permanezca asociado a la superficie de la proteína portadora. Presentando así el péptido en una conformación que se parezca lo más posible a la del péptido según se encuentra en el contexto de la molécula natural completa. Por ejemplo, los péptidos pueden alterarse para que tengan una cisteína N terminal y una cola amidada hidrófoba C terminal. Alternativamente, puede realizarse la adición o la sustitución de una forma estereoisómera D de uno o más de los aminoácidos para crear un derivado beneficioso, por ejemplo, para mejorar la estabilidad del péptido.

Alternativamente, los mimótopos peptídicos pueden identificarse usando anticuerpos que son capaces de unirse por sí mismos a los polipéptidos de la presente invención usando técnicas tales como la tecnología de presentación de fagos (documento EP 0 552 267 B1). Esta técnica genera un gran número de secuencias peptídicas que mimetizar la estructura de los péptidos naturales, y son por lo tanto capaces de unirse a anticuerpos anti-péptidos naturales, pero pueden no compartir necesariamente por sí mismos un homología de secuencia significativa con el polipéptido natural.

Vacunas

La invención también proporciona una composición de vacuna que comprende:

- (i) una cantidad eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno;
- (ii) un portador farmacéuticamente aceptable; y
- (iii) un coadyuvante seleccionado del grupo que consiste en 3 Des-O-acilado monofosforil lípido A, QS21, QS21 y colesterol.

La invención también proporciona una composición de vacuna que comprende

- (i) una cantidad eficaz de un polinucleótido que tiene una identidad de al menos el 85% con la de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5;
- (ii) un portador farmacéuticamente aceptable; y
- (iii) un coadyuvante seleccionado del grupo que consiste en 3 Des-O-acilado monofosforil lípido A, QS21, QS21 y colesterol.

La invención también proporciona el uso de (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 o (ii) un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (iii) un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno, en la preparación de un medicamento para prevenir la infección por *Neisseria meningitidis*.

La invención también proporciona el uso de un polinucleótido con una identidad de al menos el 85% con la de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, en la preparación de un medicamento para prevenir la infección por *Neisseria meningitidis*.

La invención también proporciona un polipéptido o un fragmento inmunógeno seleccionado del grupo que consiste en (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6; (ii) un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6; y (iii) un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno, para su uso en la prevención de la infección por *Neisseria meningitidis*.

La invención también proporciona un polinucleótido con una identidad de al menos el 85% con la de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, para su uso en la prevención de la infección por *Neisseria meningitidis*.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, particularmente un mamífero, preferiblemente seres humanos, que comprende inocular al individuo con polinucleótido y/o polipéptido BASB041, o un fragmento o variante de los mismos, adecuados para producir una respuesta inmunitaria por anticuerpos y/o linfocitos T para proteger a dicho individuo de una infección, particularmente de una infección bacteriana y muy particularmente de una infección por *Neisseria meningitidis*.

También se proporcionan procedimientos mediante los cuales dicha respuesta inmunitaria ralentiza la replicación bacteriana. Otro aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo que comprende proporcionar a dicho individuo un vector de ácido nucleico, secuencia o ribozima para dirigir la expresión del polinucleótido y/o el polipéptido BASB041, o un fragmento o una variante de los mismos *in vivo* con objeto de inducir una respuesta inmunitaria, tal como, producir una respuesta inmunitaria por anticuerpos y/o linfocitos T, incluyendo, por ejemplo, linfocitos T productores de citocinas o linfocitos T citotóxicos, para proteger a dicho individuo, preferiblemente un ser humano, de la enfermedad, tanto si la enfermedad ya se ha establecido en el individuo como si no. Un ejemplo de administración del gen es acelerándolo en las células deseadas como un recubrimiento sobre partículas o de otra forma. Dicho vector de ácido nucleico puede comprender ADN, ARN, una ribozima, un ácido nucleico modificado, un híbrido de ADN/ARN, un complejo de ADN-proteína o un complejo de ARN-proteína.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición inmunológica que, cuando se introduce en un individuo, preferiblemente un ser humano, capaz de producir una respuesta inmunológica inducida, induce una respuesta inmunológica en dicho individuo frente a un polinucleótido y/o polipéptido BASB041 codificado a partir de los mismos, en el que la composición comprende un polinucleótido y/o polipéptido BASB041 recombinante codificado a partir de los mismos y/o comprende ADN y/o ARN que codifican y expresan un antígeno de dicho polinucleótido y/o polipéptido BASB041 codificado a partir de los mismos, u otro polipéptido de la invención. La respuesta inmunológica puede usarse terapéutica o profilácticamente, y puede tener la forma de una inmunidad por anticuerpos y/o una inmunidad celular, tal como una inmunidad celular a partir de CTL o linfocitos T CD4+.

Pueden fusionarse un polipéptido BASB041 o un fragmento del mismo con una coproteína o una fracción química que puede o no puede producir por sí misma anticuerpos, pero que es capaz de estabilizar la primera proteína y producir una proteína modificada o fusionada que tenga propiedades antigénicas y/o inmunógenas, y preferiblemente propiedades protectoras. Por lo tanto, la proteína recombinante fusionada, comprende preferiblemente además una coproteína antigénica, tal como la lipoproteína D de *Haemophilus influenzae*, Glutathion-S-transferasa (GST) o beta-galactosidasa, o cualquier otra coproteína relativamente grande que solubilice la proteína y facilite la producción y purificación de la misma. Además, la coproteína puede actuar como un coadyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmunitario del organismo que recibe la proteína. La coproteína puede estar unida al amino o carboxi terminal de la primera proteína.

En una composición de vacuna según la invención, puede haber presente un polipéptido y/o polinucleótido BASB041, o un fragmento descrito en este documento, en un vector, tal como los vectores recombinantes vivos descritos anteriormente, por ejemplo, vectores bacterianos vivos.

También son adecuados vectores no vivos para el polipéptido BASB041, por ejemplo, vesículas de la membrana externa bacteriana o "bullas". Las bullas de la membrana externa derivan de la membrana externa bicapa de bacterias gramnegativas y se han documentado en muchas bacterias gramnegativas (Zhou, L y col. 1998. FEMS Microbiol. Lett. 16: 223-228) incluyendo *C. trachomatis* y *C. psittaci*. Una lista no exhaustiva de patógenos bacterianos referidos como productores de bullas también incluye: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica*.

Las bullas tienen la ventaja de proporcionar las proteínas de la membrana externa en su conformación natural, y son por lo tanto particularmente útiles para las vacunas. Las bullas también pueden mejorarse para su uso en vacunas modificando la bacteria de forma que se modifique la expresión de una o más moléculas en la membrana externa. Así, por ejemplo, puede introducirse o regularse por incremento la expresión de una proteína inmunógena deseada de la membrana externa, tal como el polipéptido BASB041 (por ejemplo, alterando el promotor). En su lugar, o además, puede regularse por disminución la expresión de moléculas de la membrana externa que bien no son de

interés (por ejemplo, antígenos no protectores o proteínas inmunodominantes pero variables) o que son perjudiciales (por ejemplo, moléculas tóxicas tales como LPS, o potenciales inductores de una respuesta autoinmune). Estas metodologías se discuten con más detalle a continuación.

Las regiones flanqueantes no codificantes del gen BASB0411 contienen elementos reguladores importantes en la expresión del gen. Esta regulación tiene lugar tanto a nivel transcripcional como traduccional. La secuencia de estas regiones, tanto en dirección 5' como en dirección 3' del marco abierto de lectura del gen, pueden obtenerse mediante secuenciación del ADN. Esta información de secuencia permite la determinación de potenciales motivos reguladores tales como los diferentes elementos promotores, secuencias de terminación, elementos de secuencias inducibles, represores, elementos responsables de la variación de fase, la secuencia de shine-dalgarno, regiones con una potencial estructura secundaria implicada en la regulación, así como otros tipos de motivos o secuencias reguladores.

Esta información de la secuencia permite la modulación de la expresión natural del gen BASB041. La regulación por incremento de la expresión del gen puede realizarse alterando el promotor, la secuencia de shine-dalgarno, el represor potencial o los elementos operadores, o cualquier otro elemento implicado. Asimismo, la regulación por disminución de la expresión puede conseguirse mediante unos tipos similares de modificación. Alternativamente, cambiando las secuencias de variación de fase, puede ponerse bajo el control de la variación de fase la expresión del gen, o puede desacoplarse de esta regulación. En otra metodología, la expresión del gen puede ponerse bajo el control de uno o más elementos inducibles que permitan una expresión regulada. Algunos ejemplos de dicha regulación incluyen, pero no se limitan a, una inducción mediante cambio de temperatura, la adición de sustratos inductores como carbohidratos seleccionados por sus derivados, oligoelementos, vitaminas, cofactores, iones metálicos, etc.

Modificaciones tales como las descritas anteriormente pueden producirse mediante muchos medios diferentes. La modificación de las secuencias implicadas en la expresión génica puede llevarse a cabo *in vivo* mediante mutagénesis aleatoria, seguido de la selección del genotipo deseado. Otra metodología consiste en el aislamiento de la región de interés y su modificación mediante mutagénesis aleatoria, o una mutagénesis por sustitución, inserción o delección dirigida. Entonces la región modificada puede reintroducirse en el genoma bacteriano mediante recombinación homóloga, y puede evaluarse el efecto sobre la expresión génica. En otra metodología puede usarse el conocimiento de la secuencia de la región de interés para sustituir o eliminar todas o parte de las secuencias reguladoras naturales. En este caso, la región reguladora objetivo se aísla y modifica de forma que contenga los elementos reguladores de otro gen, una combinación de elementos reguladores de diferentes genes, una región reguladora sintética o cualquier otra región reguladora, o para deleccionar partes seleccionadas de las secuencias reguladoras naturales. Estas secuencias modificadas pueden reintroducirse entonces en la bacteria a través de una recombinación homóloga en el genoma. Una lista no exhaustiva de promotores preferidos que podrían usarse para la regulación por incremento de la expresión génica incluye los promotores *porA*, *porB*, *1bpB*, *tbpB*, *p110*, *1st*, *hpuAB* de *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*; *ompCD*, *copB*, *1bpB*, *ompE*, *UspA1*; *UspA2* *TbpB* de *M. Catarrhalis*; *p1*, *p2*, *p4*, *p5*, *p6*, *1pD*, *tbpB*, *D15*, *Hia*, *Hmw1* *Hmw2* de *H. influenzae*.

En un ejemplo, la expresión del gen puede modularse intercambiando su promotor por un promotor más fuerte (aislando en dirección 5' del gen la secuencia, modificando *in vitro* esta secuencia y reintroduciéndola en el genoma mediante recombinación homóloga). La expresión regulada por incremento puede obtenerse tanto en la bacteria como en las vesículas de la membrana externa desprendida (o hecha a partir de) la bacteria.

En otros ejemplos pueden usarse las metodologías descritas para generar cepas bacterianas recombinantes con unas características mejoradas para aplicaciones en vacunas. Estas pueden ser, pero no se limitan a, cepas atenuadas, cepas con un incremento en la expresión de antígenos seleccionados, cepas con genes inactivados (o con una expresión disminuida) que interfieren en la respuesta inmunitaria, cepas con una expresión modulada de proteínas inmunodominantes, cepas con un desprendimiento modulado de las vesículas de la membrana externa.

En este documento también se describe una región modificada en dirección 5' del gen BASB041, región codificada en dirección 5' que contiene un elemento regulador heterólogo que altera el nivel de expresión de la proteína BASB041 localizada en la membrana externa. La región en dirección 5' según este aspecto de la invención incluye la secuencia en dirección 5' del gen BASB041. La región en dirección 5' comienza inmediatamente en dirección 5' del gen BASB041 y habitualmente continúa hasta una posición a no más de aproximadamente 1.000 pb en dirección 5' del gen desde el codón de inicio ATG. En el caso de un gen localizado en una secuencia policistónica (operón), la región en dirección 5' puede empezar inmediatamente precedente al gen de interés, o preceder al primer gen del operón. La región modificada en dirección 5' puede contener un promotor heterólogo en una posición a entre 500 y 700 pb en dirección 5' del ATG.

En este documento también se describe un polipéptido BASB041 en una bula bacteriana modificada. También se describen en este documento células hospedadoras modificadas capaces de producir los vectores de las bullas basadas en la membrana no vivos. En este documento también se describen vectores de ácidos nucleicos que comprenden el gen BASB041 con una región modificada en dirección 5' que contiene un elemento regulador heterólogo.

En este documento también se describen procedimientos para preparar las células hospedadoras y las bullas bacterianas según la invención.

En este documento también se describen composiciones, particularmente composiciones de vacunas, y procedimientos que comprenden los polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención y secuencias de ADN inmunoestimulantes, tales como las descritas en Sato, Y. y col. Science 273: 352 (1996).

Esta invención también proporciona procedimientos que usan el polinucleótido descrito o fragmentos particulares, de los que se ha demostrado que codifican para regiones no variables de proteínas de la superficie celular bacteriana, en constructos polinucleotídicos usados en dichos experimentos de inmunización genética en modelos animales de infección por *Neisseria meningitidis*. Dichos experimentos serán particularmente útiles para la identificación de epítomos proteicos capaces de provocar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica. Se cree que esta metodología permitirá la subsiguiente preparación de anticuerpos monoclonales de especial valor, derivados del órgano requerido del animal que resiste o se libera satisfactoriamente de la infección, para el desarrollo de agentes profilácticos o tratamientos terapéuticos de la infección bacteriana, particularmente una infección por *Neisseria meningitidis*, en mamíferos, particularmente en seres humanos.

La invención también incluye una formulación de vacuna que comprende un polipéptido y/o polinucleótido recombinante inmunógeno de la invención junto con un portador adecuado, tal como un portador farmacéuticamente aceptable. Dado que los polipéptidos y polinucleótidos pueden degradarse en el estómago, es preferible que cada uno se administre por vía parenteral, incluyendo, por ejemplo, una administración que es subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica. Las formulaciones adecuadas para su administración por vía parenteral incluyen disoluciones estériles para inyección acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con respecto a los fluidos corporales, preferiblemente la sangre, del individuo; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases unidos o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales precintados, y pueden almacenarse en estado liofilizado que sólo requiere la adición del portador líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

La formulación de vacuna de la invención también puede incluir sistemas coadyuvantes para mejorar la inmunogenicidad de la formulación. Preferiblemente, el sistema coadyuvante provoca preferiblemente una respuesta inmunitaria de tipo TH1.

Una respuesta inmunitaria puede distinguirse ampliamente en dos categorías extremas, que son respuestas inmunitarias humores o mediadas por células (caracterizadas tradicionalmente por mecanismos que efectores de protección de anticuerpos y celulares, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado en respuestas de tipo TH1 (respuesta mediada por células), y respuestas inmunitarias de tipo TH2 (respuestas humores).

Las respuestas inmunitarias extremas de tipo TH1 pueden caracterizarse por la generación de linfocitos T citotóxicos de haplotipo restringido específicos de antígeno, y respuestas de linfocitos citolíticos naturales. En ratones, las respuestas de tipo TH1 se caracterizan a menudo por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano estos se corresponden con anticuerpos del tipo IgG1. Las respuestas inmunitarias de tipo TH2 se caracterizan por la generación de una amplia gama de isotipos de inmunoglobulinas, incluyendo, en ratones, IgG1, IgA e IgM.

Puede considerarse que la fuerza conductora que impulsa el desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunitarias son las citocinas. Unos niveles altos de citocinas de tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células ante un antígeno dado, mientras que unos niveles altos de citocinas de tipo TH2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humores frente al antígeno.

La distinción entre respuestas inmunitarias de tipo TH1 y TH2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente TH1 o predominantemente TH2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de las descritas en clones de linfocitos T CD4 +ve murinos por Mosmann y Coffman (Mosmann, T. R. y Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, págs. 145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo TH1 se asocian con la producción de INF- γ y citocinas IL-2 por parte de los linfocitos T. Otras citocinas a menudo asociadas directamente con la inducción de respuestas inmunitarias de tipo TH1 no son producidas por los linfocitos T, tales como la IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo TH2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

Se sabe que ciertos coadyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de las respuestas de citocinas de tipo TH1 o TH2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio TH1:TH2 de la respuesta inmunitaria tras una vacunación o infección incluyen la medida directa de la producción de citocinas TH1 o TH2 por los linfocitos T *in vitro* tras la reestimulación con un antígeno, y/o la medida de la proporción IgG1:IgG2a de las respuestas a anticuerpos específicas de antígeno.

Por lo tanto, un coadyuvante de tipo TH1 es aquel que estimula preferentemente poblaciones aisladas de linfocitos T

para producir altos niveles de citocinas de tipo TH1 cuando se reestiman con un antígeno *in vitro*, y promueve el desarrollo tanto de respuestas de linfocitos T citotóxicos CD8+ como de inmunoglobulinas específicas de antígeno asociadas con el isotipo de tipo TH1.

5 Los coadyuvantes que son capaces de una estimulación preferente de la respuesta celular TH1 se describen en las Solicitudes de Patente Internacional N° WO 94/00153 y WO 95/17209.

El 3 des-O-acilado monofosforil lípido A (3D-MPL) es uno de dichos coadyuvantes. Se conoce a partir del documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente es una mezcla de 3 des-O-acilado monofosforil lípido A con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas, y es elaborado por Ribi Immunochem, Montana. Una forma preferida del 3 des-O-acilado monofosforil lípido A se desvela en la Patente Europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

10 Preferiblemente, las partículas de 3D-MPL son lo suficientemente pequeñas como para ser filtradas estériles a través de una membrana de 0,22 micrómetros (Patente Europea número 0 689 454).

El 3D-MPL estará presente en el intervalo de 10 µg – 100 µg, preferiblemente de 25-50 µg por dosis, en la que el antígeno estará presente típicamente en un intervalo de 2-50 µg por dosis.

15 Otro coadyuvante y preferido comprende QS21, una fracción no tóxica purificada mediante HPLC derivada de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. Opcionalmente, puede mezclarse con 3 des-O-acilado monofosforil lípido A (3D-MPL), opcionalmente junto con un portador.

El procedimiento de producción de QS21 se desvela la patente de EE.UU. N° 5.057.540.

20 Las formulaciones con coadyuvantes no reactogénicas que contienen QS21 han sido descritas previamente (documento WO 96/33739). Se ha demostrado que dichas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son eficaces coadyuvantes estimulantes de TH1 cuando se formulan junto con un antígeno.

Algunos coadyuvantes adicionales que son estimuladores preferentes de la respuesta celular TH1 incluyen oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo, secuencias de CpG no metiladas, según se desvela en el documento WO 96/02555.

25 También se contemplan combinaciones de diferentes coadyuvantes estimuladores de TH1, tales como los mencionados anteriormente en este documento, para proporcionar un coadyuvante que sea un estimulador preferente de la respuesta celular TH1. Por ejemplo, puede formularse QS21 junto con 3D-MPL. La proporción QS21:3D-MPL será típicamente del orden de 1:10 a 10:1; preferiblemente de 1:5 a 5:1, y a menudo sustancialmente de 1:1. El intervalo preferido para una sinergia óptima es de 2,5:1 a 1:1 de 3D-MPL:QS21.

30 Preferiblemente también hay presente un portador en la composición de vacuna según la invención. El portador puede ser una emulsión de aceite en agua o una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

35 Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, alfa tocoferol y Tween 80. En un aspecto particularmente preferido, los antígenos de la composición de vacuna según la invención se combinan con QS21 y 3D-MPL en dicha emulsión. Adicionalmente, la emulsión de aceite en agua puede contener span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

40 Típicamente, para su administración a seres humanos, los QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo de 1 µg – 200 µg, tal como de 10 - 100 µg, preferiblemente de 10 µg – 50 µg por dosis. Típicamente, el aceite en agua comprenderá del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de alfa tocoferol y del 0,3 al 3% de tween 80. Preferiblemente, la proporción de escualeno:alfa tocoferol es igual o inferior a 1, ya que esto proporciona una emulsión más estable. También puede estar presente el span 85 a un nivel del 1%. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizante.

Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas contienen preferiblemente un aceite no tóxico, por ejemplo, escualano o escualeno, un emulsionante, por ejemplo, Tween 80, en un portador acuoso. El portador acuoso puede ser, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato.

45 Un coadyuvante de formulación particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

50 La presente invención también proporciona una composición de vacuna polivalente que comprende una formulación de vacuna de la invención en combinación con otros antígenos, en particular antígenos útiles para el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunes y dolencias relacionadas. Dicha composición de vacuna polivalente puede incluir un coadyuvante inductor de TH-1 según se describió anteriormente en este documento.

Mientras que la invención se ha descrito con referencia a ciertos polipéptidos y polinucleótidos BASB041, se debe entender que ésta cubre fragmentos de los polipéptidos y polinucleótidos naturales, y polipéptidos y polinucleótidos similares con adiciones, deleciones por sustituciones que no afecten sustancialmente a las propiedades

inmunógenas de los polipéptidos o polinucleótidos recombinantes.

El antígeno también puede administrarse en forma de bacterias completas (muertas con vivas) o como fracciones subcelulares, estas posibilidades incluyen la propia *N. meningitidis*.

Composiciones, Kits y Administración

- 5 En un aspecto adicional de la invención se proporcionan composiciones que comprenden un polinucleótido BASB041 y/o un polipéptido BASB041 para su administración a una célula o a un organismo multicelular.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden un polinucleótido y/o un polipéptido discutido en este documento. Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención pueden emplearse en combinación con un portador o portadores no estériles o estériles para su uso con células, tejidos u órganos, tales como un portador farmacéuticamente adecuado para su administración a un individuo. Dichas composiciones comprenden, por ejemplo, un aditivo del medio o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido y/o polinucleótido de la invención, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos portadores pueden incluir, pero no se limitan a, disolución salina, disolución salina tamponada, glucosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debe ajustarse al modo de administración. También se describen en este documento envases y kits diagnósticos y farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas anteriormente. Los polipéptidos, polinucleótidos y otros compuestos de la invención pueden emplearse solos o en conjunción con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de cualquier forma conveniente y eficaz que incluye, por ejemplo, la administración por vía tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica entre otras.

En una terapia o como profiláctico, el agente activo puede administrarse a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo, como una dispersión acuosa estéril, preferiblemente isotónica.

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido y/o polinucleótido, tal como la forma soluble de un polipéptido y/o polinucleótido de la presente invención, un péptido agonista o antagonista o un compuesto de moléculas pequeñas, en combinación con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos portadores incluyen, pero no se limitan a, disolución salina, disolución salina tamponada, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La invención se refiere además a envases y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas anteriormente. Los polipéptidos, polinucleótidos y otros compuestos de la invención pueden emplearse solos o en conjunción con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

35 La composición estará adaptada a la vía de administración, por ejemplo, a través de una vía sistémica u oral. Algunas formas preferidas de administración sistémica incluyen la inyección, típicamente la inyección intravenosa. Pueden usarse otras vías de inyección, tales como subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Algunos medios alternativos para la administración sistémica incluyen la administración transmucosal y transdérmica usando penetrantes tales como sales biliares o ácidos fusídicos. Además, si un polipéptido u otros compuestos de la presente invención pueden formularse en una formulación entérica o encapsulada, la administración por vía oral también puede ser posible. La administración de estos compuestos también puede ser por vía tópica y/o localizada, en forma de bálsamos, pastas, geles, disoluciones, polvos y similares.

45 Para su administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que el nivel de dosis diaria del agente activo sea desde 0,01 mg/kg hasta 10 mg/kg, típicamente de alrededor de 1 mg/kg. El médico determinará en cualquier caso la dosis real, que será la más adecuada para un individuo, y variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo en particular. Las dosis anteriores son ejemplos del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos particulares en los que se requieran intervalos de dosificación mayores o menores, y éstos están en el ámbito de esta invención.

El intervalo de dosificación requerido depende de la elección del péptido, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza del estado del sujeto y el juicio del facultativo. Las dosis adecuadas, sin embargo, están en el intervalo de 0,1-100 µg/kg del sujeto.

50 Una composición de vacuna está convenientemente en forma inyectable. Pueden emplearse coadyuvantes convencionales para mejorar la respuesta inmunitaria. Una dosis unitaria adecuada para vacunación que es de 0,5-5 microgramos/kg de antígeno, y dicha dosis se administra preferiblemente 1-3 veces y con un intervalo de 1-3 semanas. Con el intervalo de dosis sindicado, no se observarán efectos toxicológicos adversos con los compuestos de la invención que podrían descartar su administración a individuos adecuados.

55 Sin embargo, se esperan amplias variaciones en las dosis requeridas en vista de la variedad de compuestos disponibles y de las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Por ejemplo, se esperaría que la

administración por vía oral requiriera dosis mayores que la administración mediante inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para su optimización, como bien se entiende en la materia.

Bases de Datos de Secuencias, Secuencias en un Medio Tangible y Algoritmos

- 5 Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos forman una valiosa fuente de información con la que determinar sus estructuras bi y tridimensionales, así como para identificar secuencias adicionales de homología similar. Estas metodologías se facilitan mucho almacenando la secuencia en un medio legible informáticamente, y después usando los datos almacenados en un programa de estructuras macromoleculares conocido para buscar en una base de datos de secuencias usando herramientas de búsqueda conocidas, tales como el conjunto de programas GCG.
- 10 La invención también proporciona procedimientos para el análisis de las secuencias de caracteres o series, particularmente secuencias genéticas o secuencias proteicas codificadas. Algunos procedimientos de análisis de secuencia preferidos incluyen, por ejemplo, procedimientos de análisis de homología de secuencia, tales como análisis de identidad y similitud, análisis estructural de ADN, ARN y proteínas, ensamblaje de secuencias, análisis cladístico, análisis de motivos de secuencias, determinación del marco abierto de lectura, lectura automática de ácidos nucleicos, análisis del uso de codones, recorte de ácidos nucleicos y análisis de picos cromatográficos de secuenciación.

Se proporciona un procedimiento informático para realizar la identificación de homologías. Este procedimiento comprende las etapas de: proporcionar una primera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de un polinucleótido de la invención en un medio legible informáticamente; y comparar dicha primera secuencia polinucleotídica con al menos una segunda secuencia de polinucleótidos o polipéptidos para identificar homologías.

También se proporciona un procedimiento informático para realizar la identificación de homologías, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: proporcionar una primera secuencia polipeptídica que comprende la secuencia de un polipéptido de la invención en un medio legible informáticamente; y comparar dicha primera secuencia polipeptídica con al menos una segunda secuencia de polinucleótidos o polipéptidos para identificar homologías.

Definiciones

"Identidad," como se sabe en la materia, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, según sea el caso, determinada mediante la comparación de las secuencias. En la materia, "identidad" también significa el grado de parentesco de secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según sea el caso, determinado mediante la coincidencia entre las series de dichas secuencias. La "identidad" puede calcularse fácilmente mediante procedimientos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en (Computation Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H. y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los procedimientos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Además, los procedimientos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos a disposición pública. Los procedimientos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el programa GAP del conjunto de programas GCG (Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S. F. y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) y FASTA (Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444-2448 (1988). La familia de programas BLAST está a disposición pública en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). Para determinar la identidad también puede usarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman.

45 Los parámetros para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915-10919 (1992)

Penalización por salto: 8

Penalización por longitud del salto: 2

50 Un programa útil con estos parámetros se encuentra a disposición pública como el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos (junto con ninguna penalización para los saltos en los extremos).

Los parámetros para la comparación de polinucleótidos incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

55 Matriz de comparación: coincidencias = +10, no coincidencias = 0

Penalización por salto: 50

Penalización por longitud del salto: 3

Disponible como: el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Estos son los parámetros parámetros por defecto para comparaciones de ácidos nucleicos.

Un significado preferido para "identidad" en polinucleótidos y polipéptidos, según sea el caso, se proporciona en (1) y (2) a continuación.

(1) Algunas formas de realización de polinucleótidos incluyen adicionalmente un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos con una identidad de al menos el 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 o 100% con la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 1, en las que dicha secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 1 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones nucleotídicas en comparación con la secuencia de referencia, en las que dichas alteraciones se eligen del grupo que consiste en al menos una delección, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción de nucleótido, y en las que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia, y en las que dicho número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 por el número entero que define porcentaje de identidad dividido entre 100 y restando después ese producto de dicho número total de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y),$$

en la que n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, e y es, 0,50 para el 50%, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,95 para el 95%, 0,97 para el 97% o 1,00 para el 100%, y \bullet es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que todo producto de x_n e y que no sea un número entero se redondea por debajo al número entero más cercano antes de restarlo de x_n . Las alteraciones de una secuencia polinucleotídica que codifica para el polipéptido de la SEC ID N°: 2 pueden crear mutaciones sin sentido, mutaciones erróneas o mutaciones por desplazamiento del marco de lectura en esta secuencia codificante, y alterar así el polipéptido codificado por el polinucleótido después de estas alteraciones. A modo de ejemplo, una secuencia polinucleotídica de la presente invención puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 1, esto es, puede ser idéntica en el 100%, o puede incluir hasta un determinado número entero de alteraciones de ácidos nucleicos en comparación con la secuencia de referencia, tal que el porcentaje de identidad sea inferior a una identidad del 100%. Dichas alteraciones se eligen del grupo que consiste en al menos una delección, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción de un ácido nucleico, y en la que dichas alteraciones pueden tener lugar en las posiciones 5' o 3' de la secuencia polinucleotídica de referencia o en un lugar cualquiera entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los ácidos nucleicos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de ácidos nucleicos para un porcentaje de identidad dado se determina multiplicando el número total de ácidos nucleicos de la SEC ID N°: 1 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido entre 100 y restando después ese producto de dicho número total de ácidos nucleicos de la SEC ID N°: 1, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y),$$

en la que n_n es el número de alteraciones de ácidos nucleicos, x_n es el número total de ácidos nucleicos de la SEC ID N°: 1, y es, por ejemplo, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, etc., \bullet es el símbolo del operador de multiplicación, y la que todo producto de x_n e y que no sea un número entero se redondea por debajo al número entero más cercano antes de restarlo de x_n .

(2) Algunas formas de realización de polipéptidos incluyen adicionalmente un polipéptido aislado que comprende un polipéptido con una identidad de al menos el 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 o 100% con la de una secuencia polipeptídica de referencia de la SEC ID N°: 2, en las que dicha secuencia polipeptídica puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 2 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia, en las que dichas alteraciones se eligen del grupo que consiste en delección, sustitución, incluyendo sustituciones conservadoras y no conservadoras, o inserción, de al menos un aminoácido, y en las que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia, y en las que dicho número de alteraciones de aminoácidos se determina multiplicando el número total de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 por el número entero que define porcentaje de identidad dividido entre 100 y restando después ese producto de dicho número total de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o:

$$N_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

en la que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y es, 0,50 para el 50%, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,95 para el 95%, 0,97 para el 97% o 1,00 para el 100%, y \bullet es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que todo producto de x_a e y que no sea un número entero se redondea por debajo al número entero más cercano antes de restarlo de x_a .

A modo de ejemplo, una secuencia polipeptídica de la presente invención puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 2, esto es, puede ser idéntica en el 100%, o puede incluir hasta un determinado número entero de alteraciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia, de forma que el porcentaje de identidad sea menor del 100% de identidad. Dichas alteraciones se eligen del grupo que consiste en al menos una delección, sustitución, incluyendo sustituciones conservadoras y sustituciones no conservadoras, o inserción, de al menos un aminoácido, y en la que dichas alteraciones pueden tener lugar en las posiciones amino o carboxi terminal de la secuencia polipeptídica de referencia o en un lugar cualquiera entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácidos correspondiente a un determinado porcentaje de identidad se determina multiplicando el número total de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 por el número entero que define porcentaje de identidad dividido entre 100 y restando después ese producto de dicho número total de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

en la que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y es, por ejemplo, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, etc., y \bullet es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que todo producto de x_a e y que no sea un número entero se redondea por debajo al número entero más cercano antes de restarlo de x_a .

"Individuo(s)," cuando se usa en este documento con referencia a un organismo, significa un eucariota pluricelular, incluyendo, pero no limitándose a, un metazoo, a un mamífero, un óvulo, un bóvido, un simio, un primate y un ser humano.

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" desde su estado natural, es decir, si está en la naturaleza, ha sido modificado o eliminado de su entorno natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", según se emplea el término en este documento. Además, un polinucleótido o polipéptido que es introducido en un organismo mediante transformación, manipulación genética o mediante cualquier otro procedimiento recombinante está "aislado" incluso si aún está presente en dicho organismo, organismo que puede estar vivo o no.

"Polinucleótido(s)" se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxiribonucleótido, que puede ser un ARN o un ADN modificado o un ARN o un ADN modificado que incluye regiones mono y bicatenarias.

"Variante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia, pero que conserva propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere de la secuencia de nucleótidos de otra secuencia de polinucleótidos de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios en el nucleótido pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, delecciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, según se discute a continuación. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias están limitadas, de forma que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante son muy similares globalmente y, en muchas regiones, idénticas. Un polipéptido variante y de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones, delecciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede o no estar codificado por el código genético. Una variante de un polinucleótido o un polipéptido puede ser una variante natural, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se conoce en estado natural. Las variantes no naturales de y polinucleótidos y polipéptidos pueden realizarse mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

"Enfermedad(es)" significa cualquier enfermedad causada por, o relacionada con, la infección por una bacteria, incluyendo, por ejemplo, infección del tracto respiratorio superior, infecciones bacterianas invasivas, tales como bacteriemia y meningitis.

Ejemplos

Los ejemplos, a continuación, se llevan a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia, salvo que de otro modo se describa detalladamente. Los ejemplos son ilustrativos pero no limitantes de la invención.

Ejemplo 1**Secuenciación del ADN del gen BASB041 a partir de dos cepas de *N. meningitidis*.****A: BASB041 en la cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B ATCC13090.**

El gen BASB041 de la cepa de *N. meningitidis* ATCC 13090 se muestra en la SEC ID N°: 1. La traducción de la secuencia de polinucleótidos de BASB041, mostrada en la SEC ID N°: 2, muestra una similitud significativa (identidad del 28% en una superposición de 130 aminoácidos) con una hipotética proteína de *Aquifex aeolicus*. El polipéptido BASB041 contiene una característica secuencia de señalización de una lipoproteína, y por lo tanto puede insertarse en la membrana externa de la bacteria.

La secuencia del gen BASB041 fue adicionalmente confirmada como sigue. Para ese propósito se extrajo el ADN genómico a partir de 10^{10} células de las células de *N. meningitidis* (cepa ATCC 13090) usando el kit de extracción de ADN genómico de QIAGEN (Qiagen GmbH), y se sometió 1 µg de este material a una amplificación del ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores lip5-01 (5'- AAT GAA AAC CGT TTC CAC CGC -3') [SEC ID N°: 7] y lip5-02 (5'-TCA TTT CTC CTT AAC GGT-3') [SEC ID N°: 8]. Este producto de la PCR se purificó en gel y se sometió a una secuenciación del ADN usando el kit de secuenciación Big Dye Cycle (Perkin-Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM. La secuenciación del ADN se realizó en ambas hebras con una redundancia de 2 y la secuencia completa se ensambló usando el programa SeqMan del paquete de programas informáticos DNASTAR Lasergene. La secuencia de ADN resultante y la secuencia deducida del polipéptido se muestran como la SEC ID N°: 3 y la SEC ID N°: 4, respectivamente. Debería apreciarse que la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 3 tiene un nucleótido adicional en la posición 616 con respecto a la SEC ID N°: 1.

B: BASB041 en la cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B H44/76.

También se determinó la secuencia del gen BASB041 en otra cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B, la cepa H44/76. Para este propósito se extrajo el ADN genómico a partir de la cepa *N. meningitidis* H44/76 usando las condiciones experimentales presentadas en el párrafo previo. Este material (1 µg) se sometió entonces a una amplificación del ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores Lip5-01 y Lip5-02 específicos para el gen BASB041. El amplicón de la PCR se sometió entonces a una secuenciación del ADN usando el kit Big Dyes (Applied biosystems) y se analizó con un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el fabricante. Como resultado se obtuvieron las secuencias del polinucleótido y del polipéptido deducido, denominadas como SEC ID N°: 5 e SEC ID N°: 6, respectivamente. Debería apreciarse que la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 5 tiene un nucleótido adicional en la posición 616 con respecto a la SEC ID N°: 1. Usando el programa MegAlign del paquete DNASTAR Lasergene, se realizó una alineación de las secuencias de polinucleótidos de las SEC ID N°: 1, 3 y 5, y se muestra en la Figura 1; en la Tabla 1 se resume una comparación por parejas de identidades que muestran que las tres secuencias de polinucleótidos del gen BASB041 son todas similares con un nivel de identidad mayor del 99,0%. Usando el mismo programa MegAlign se realizó una alineación de las secuencias de polipéptidos de las SEC ID N°: 2, 4 y 6, y se muestra en la Figura 2. En la Tabla 2 se resume una comparación por parejas de identidades que muestran que las SEC ID N°: 4 y 6 son idénticas en un 100%; su disimilitud con la SEC ID N°: 2 está contenida completamente en los últimos 18 residuos, y es debida al nucleótido ausente en la SEC ID N°: 1 con respecto a las SEC ID N°: 3 y 5.

Tomados conjuntamente, estos datos indican una fuerte conservación de la secuencia del gen BASB041 entre las dos cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B.

Tabla 1: identidades por parejas de las secuencias de polinucleótidos de BASB041 (en %)

	SEC ID N°: 3	SEC ID N°: 5
SEC ID N°: 1	99,8%	99,2%
SEC ID N°: 3		99,4%

Tabla 2: identidades por parejas de las secuencias de polipéptidos de BASB041 (en %)

	SEC ID N°: 4	SEC ID N°: 6
SEC ID N°: 2	92,3%	92,3%
SEC ID N°: 4		100%

Construcción de un plásmido para expresar BASB041 recombinante**A: clonación de BASB041.**

Los sitios de restricción *NdeI* y *Sall* modificados en los cebadores de amplificación directo Lip5 - Fm/p (5'- AGG CAG

AGG CAT ATG AAA ACC GTT TCC ACC GCC GTT GTC CTT GC -3') ([SEC ID N°: 9]) e inverso Lip5-RCf/p (5'-AGG CAG AGG GTC GAC TTT CTC CTT AAC GGT TGG GTT GCC ATG CGC -3') ([SEC ID N°: 10]), respectivamente, permitieron la clonación direccional de un producto de PCR de BASB041 en el plásmido de expresión de *E. coli* disponible comercialmente pET24b (Novagen, EE.UU., resistente a la kanamicina) de forma que una proteína madura BASB041 podría expresarse como una proteína de fusión que contiene una etiqueta cromatográfica de afinidad (His)₆ en el C terminal. El producto de la PCR de BASB041 se purificó a partir de la reacción de amplificación usando columnas en espiral basadas en gel de sílice (QiaGen) según las instrucciones de los fabricantes. Para producir los requeridos terminales *NdeI* y *Sall* necesarios para la clonación, el producto purificado de la PCR se digirió secuencialmente hasta su finalización con enzimas de restricción *NdeI* y *Sall* según recomienda el fabricante (Life Technologies). Tras la primera digestión de restricción, el producto de la PCR se purificó a través de una columna en espiral como anteriormente para eliminar las sales y se eluyó en agua estéril antes de la segunda digestión enzimática. El fragmento de ADN digerido se purificó de nuevo usando columnas en espiral basadas en gel de sílice antes de su ligación con el plásmido pET24b.

B: producción del vector de expresión.

Para preparar el plásmido de expresión pET24b para su ligación, se digirió similarmente hasta su finalización con *NdeI* y *Sall* y después se trató con fosfatasa intestinal bovina (*calf intestinal phosphatase*, CIP, ~0,02 unidades / pmol de extremo 5', Life Technologies) según indica el fabricante para evitar la autoligación. Se usó un exceso de aproximadamente 5 veces molar del fragmento digerido en el vector preparado para programar la reacción de ligación. Se realizó una reacción de ligación estándar de ~20 µl (~16°C, ~16 horas), usando procedimientos bien conocidos en la materia, usando ligasa de ADN T4 (~2,0 unidades / reacción, Life Technologies). Se usó una alícuota de la ligación (~5 µl) para transformar células electrocompetentes BL21 DE3 según procedimientos bien conocidos en la materia. Tras un periodo de ~2-3 horas de resultado a 37°C en ~1,0 ml de caldo LB, las células transformadas se colocaron en placas de agar LB que contenían kanamicina (50 µg/ml). El antibiótico se incluyó en el medio de selección para asegurar que todas las células transformadas portaban el plásmido pET24b (KnR). Las placas se incubaron hasta el día siguiente a 37°C durante ~16 horas. Las colonias individuales KnR se recogieron con palillos estériles y se usaron para inocular "parches" en placas nuevas LB KnR, así como ~1,0 ml de caldo de cultivo LB KnR. Tanto las placas con parches como el cultivo de caldo se incubaron hasta el día siguiente a 37°C bien en una estufa de incubación estándar (placas) o bien en un baño de agua con agitación.

Se empleó un análisis completo de PCR basado en células para verificar que los transformantes contenían el inserto de ADN BASB041. Aquí, los ~1,0 ml del cultivo de caldo LB Kn incubado hasta el día siguiente se transfirieron a un tubo de polipropileno de 1,5 ml y las células se recogieron mediante centrifugación en una microcentrifugadora Beckman (~3 min., temperatura ambiente, ~12.000 X g). El sedimento celular se suspendió en ~200 µl de agua estéril y se usó una alícuota de ~10 µl para programar una reacción de PCR con un volumen final de ~50 µl que contenía ambos cebadores de amplificación de BASB041 directo e inverso. Las concentraciones finales de los componentes de la reacción de PCR eran esencialmente las mismas que las especificadas en el ejemplo 2, excepto porque se usaron ~5,0 unidades de polimerasa *Taq*. La etapa inicial de desnaturalización a 95°C se aumentó hasta 3 minutos para asegurar la destrucción térmica de las células bacterianas y la liberación del ADN de plásmido. Se usó un ciclador térmico ABI Modelo 9700 y un perfil de 32 ciclos de amplificación térmica de tres etapas, es decir, a 95°C, 45 s; a 55-58°C, 45 s, a 72°C, 1 min, para amplificar el fragmento de PCR de BASB041 a partir de las muestras transformantes lisadas. Tras la amplificación térmica se analizó una alícuota de la reacción de ~20 µl mediante una electroforesis en gel de agarosa (0,8% de agarosa en un tampón de Tris-acetato-EDTA (TAE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante una iluminación UV tras la electroforesis en gel y una tinción con bromuro de etidio. Se electroforetizó un estándar de tamaño molecular de ADN (escalera de 1 Kb, Life Technologies) en paralelo con las muestras de prueba, y se usó para estimar el tamaño de los productos de la PCR. Los transformantes que produjeron el producto esperado de la PCR se identificaron como cepas que contenían un constructo de expresión de BASB041. Las cepas que contenían el plásmido de expresión se analizaron entonces para comprobar la expresión inducible del BASB041 recombinante.

C: análisis de la expresión de los transformantes positivos en la PCR.

Por cada transformante positivo en la PCR identificado anteriormente, se inocularon ~5,0 ml de caldo LB que contenía kanamicina (50 µg/ml) con células procedentes de las placas con parches y se hicieron crecer hasta el día siguiente a 37°C con agitación (~250 rpm). Se inoculó una alícuota del cultivo de siembra crecido hasta el día siguiente (~1,0 ml) en un matraz erlenmeyer de 125 ml que contenía ~25 ml de caldo LB Kn y se hizo crecer a 37°C con agitación (~250 rpm) hasta que la turbidez del cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de ~0,5, es decir, una fase semilogarítmica (habitualmente aproximadamente 1,5 – 2,0 horas). En ese momento se transfirió aproximadamente la mitad del cultivo (~12,5 ml) a un segundo matraz de 125 ml y se indujo la expresión de la proteína BASB041 recombinante mediante la adición de IPTG (disolución madre 1,0 M preparada en agua estéril, Sigma) hasta una concentración final de 1,0 mM. La incubación de ambos cultivos inducido y no inducido por IPTG continuó durante ~4 horas adicionales a 37°C con agitación. Las muestras de ambos cultivos (~1,0 ml) inducido y no inducido se retiraron tras el periodo de inducción, y las células se recogieron por centrifugación en una microcentrifugadora a temperatura ambiente durante ~3 minutos. Los sedimentos celulares individuales se suspendieron en ~50 µl de agua estéril y después se mezclaron con un volumen igual de tampón de muestra 2X Laemmli SDS-PAGE que contenía 2-

mercaptoetanol, y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante ~3 min para desnaturalizar las proteínas. Se cargaron volúmenes iguales (~15 µl) de ambos lisados celulares brutos inducido y no inducido con IPTG por duplicado en gel de poliacrilamida Tris/glicina al 12% (mini geles de 1 mm de espesor, Novex). Las muestras de lisados inducida y no inducida se electroforetizaron junto con marcadores de peso molecular teñidos previamente (SeeBlue, Novex) en condiciones convencionales usando un tampón estándar de desarrollo de SDS/Tris/glicina (BioRad). Después de la electroforesis, un gel se tiñó con azul brillante de comassie R250 (BioRad) y después se destiñó para visualizar la(s) nueva(s) proteína(s) inducible(s) por IPTG BASB041. El segundo gel se inmunoelectroforetizó en una membrana de PVDF (0,45 micrómetros de tamaño de poro, Novex) durante ~2 h a 4°C usando un aparato de inmunoelectroforesis BioRad Mini-Protean II y tampón de transferencia de metanol de Towbin (20%). El bloqueo de las incubaciones de membrana y anticuerpos se realizó según procedimientos bien conocidos en la materia. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-RGS (His), seguido de un segundo anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con HRP (QiaGen) para confirmar la expresión y la identidad de la proteína recombinante BASB041. La visualización del patrón reactivo de anticuerpo anti-His se realizó usando bien un sustrato insoluble ABT o bien usando Hyperfilm con el sistema quimioluminiscencia de Amersham ECL.

Producción de BASB041 Recombinante

Cepa bacteriana

Se usó una cepa de expresión recombinante de *E. coli* BL21 DE3 que contenía un plásmido pET24b que codificaba para BASB041 de *N. meningitidis* para producir una masa celular para la purificación de la proteína recombinante. La cepa de expresión se cultivó en placas de agar LB que contenían 50 µg/ml de kanamicina ("Kn") para asegurar el mantenimiento de plásmido. Para su crioconservación a -80°C, la cepa se propagó en caldo LB que contenía la misma concentración de antibiótico, y después se mezcló con un volumen igual de caldo LB que contenía un 30% (p/v) de glicerol.

Medios

El medio de fermentación usado para la producción de la proteína recombinante consistía en 2X caldo YT (Difco) que contenía 50 µg/ml de Kn. Se añadió antiespumante al medio para el fermentador a 0,25 ml/L (Antifoam 204, Sigma). Para inducir la expresión de la proteína recombinante BASB041 se añadió IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) al fermentador (1 mM, final).

Fermentación

Se inoculó un matraz erlenmeyer de siembra de 500 ml que contenía 50 ml de volumen de trabajo con 0,3 ml de cultivo congelado descongelado rápidamente, o varias colonias procedentes de un cultivo en placa de agar selectivo, y se incubaron durante aproximadamente 12 horas a 37 ± 1°C en una plataforma de agitación a 150 rpm (Innova 2100, New Brunswick Scientific). Este cultivo de siembra se usó entonces para inocular un fermentador de 5 L de volumen de trabajo que contenía 2X caldo YT y ambos antibióticos Kn. El fermentador (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific) operaba a 37 ± 1°C, a 0,2 – 0,4 VVM de inyección de aire, a 250 rpm en turbinas Rushton. El pH no se controló ni en el cultivo de siembra en matraz ni en el fermentador. Durante la fermentación, el pH varió entre 6,5 y 7,3 en el fermentador. Se añadió IPTG (disolución madre 1,0 M preparada en agua estéril) al fermentador cuando el cultivo alcanzó un crecimiento semilogarítmico (~0,7 unidades a D.O.₆₀₀). Las células se indujeron durante 2 - 4 horas y después se recogieron mediante centrifugación usando una centrífuga de alta velocidad 28RS Heraeus (Sepatech) o RC5C (Sorvall Instruments). La pasta celular se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Purificación

El imidazol y los reactivos de calidad biotecnológica o superior se obtuvieron todos en Ameresco Chemical, Solon, Ohio. Los Triton X-100 (t-Octilfenoxipolietoxi-etanol), Triton X-114, fosfato sódico monobásico y urea tenían calidad analítica o superior y se obtuvieron en Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri. La disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (1x PBS) se obtuvo en Quality Biological, Inc., Gaithersburg, Maryland. La disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (10x PBS) se obtuvo en Bio Whittaker, Walkersville, Maryland. El anticuerpo Penta-His exento de BSA se obtuvo en QiaGen, Valencia, California. La IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa AffiniPure se obtuvo en Jackson Immuno Research, West Grove, Penn. Todos los demás reactivos químicos tenían calidad analítica o superior.

La resina quelante de Ni de flujo rápido de Sepharose se obtuvo en Pharmacia, Suecia. La tris-glicina al 4-20% y los geles de poliacrilamida al 10-20% prefabricados, todos los tampones de desarrollo y disoluciones, los estándares preteñidos SeeBlue, los estándares MultiMark Multi Colored y las membranas de transferencia de PVDF se obtuvieron en Novex, San Diego, California. Los kits de tinción con plata SDS-PAGE se obtuvieron en Daiichi Pure Chemicals Company Limited, Tokio, Japón. La disolución de tinción de Coomassie se obtuvo en Bio-Rad Laboratories, Hercules, California. Los filtros de jeringa Acrodisc® PF de 0,2 µm se obtuvieron en Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan. Los filtros de jeringas desechables GD/X de 25 mm se obtuvieron en Whatman Inc., Clifton, Nueva Jersey. El tubo de diálisis de 8.000 MWCO se obtuvo en BioDesign Inc. Od New York, Carmal Nueva York. Los reactivos de ensayo de la proteína BCA y los tubos de diálisis de piel de serpiente de 3.500 MWCO se

obtuvieron en Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois.

Protocolo de extracción

La pasta celular se descongeló a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos. Se pesaron entre cinco y seis gramos de material en un tubo de centrifuga desechable de 50 ml. El antígeno recombinante BASB041 se purificó mediante extracción de las membranas celulares con Triton X114 al 1,0%, y permitiendo una partición de fases basada en el punto de opacidad del Triton X114 a 37°C. La fase de Triton X114 se diluyó con Tris HCl 50 mM que contenía un 10% de glicerol, un 5% de etilenglicol y un 0,5% de Triton X100. Esto se aplicó a un flujo rápido de Sepharose quelante de níquel. La proteína se eluye a continuación con imidazol 200 mM para purificar por afinidad la proteína marcada con histidina, y rindió más del 90% de proteína pura.

Unión de BASB041 a una resina de afinidad de níquel

Tras la extracción, la mezcla se incubó en el quelante de níquel de flujo rápido de Sepharose y se dejó a temperatura ambiente con una agitación suave durante una hora. Después de una hora, el quelante de níquel de flujo rápido de Sepharose se prepara en una columna XK16 de Pharmacia, y a continuación se eluye con tampón de imidazol 500 mM para purificar por afinidad la proteína marcada con histidina. Entonces esta fracción se dializó frente a tampón de fosfato 25 mM (pH 7,0) que contenía un 0,1% de Triton. Entonces esta muestra se aplicó a una columna TOYOPEARL BUTYL 650M que se equilibró con tampón de fosfato 25 mM (pH 7,0) que contenía cloruro sódico y un 0,1% de Triton. La elución se realizó en el siguiente tampón con tampón de 25 mM (pH 7,0) que contenía cloruro sódico 1 M y un 0,1% de Triton. Esta fracción se aplicó adicionalmente a DEAE-sepharose-FF en presencia de tris 50 mM (pH 7,5) que contenía EDTA 2 mM, cloruro sódico 10 mM y un 0,005% de Triton X100. El flujo de DEAE se dializó frente a PBS (pH 7,4) que contenía un 0,1% de Triton y se almacenó a -70 a una concentración de 490 µg/ml.

Formulación final

BASB041 se formuló mediante diálisis hasta el día siguiente frente a tres cambios de Triton X-100 al 0,1% y 1x PBS, pH 7,4. La proteína purificada se caracterizó y usos para producir anticuerpos, según se describe a continuación.

Caracterizaciones bioquímicas: SDS-PAGE y análisis por inmunotransferencia Western

La proteína purificada recombinante se resolvió en geles de poliacrilamida al 4-20% y se transfirió electroforéticamente a membranas de PVDF a 100 V durante 1 hora según se describió previamente (Thebaine y col. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 76: 4350-4354). Entonces las membranas de PVDF se pretrataron con 25 ml de disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco que contenía un 5% de leche en polvo desnatada. Todas las incubaciones subsiguientes se llevaron a cabo usando este tampón de pretratamiento. Las membranas de PVDF se incubaron con una dilución de anticuerpos con colas anti-His durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas de PVDF se lavaron entonces dos veces con tampón de lavado (tampón Tris 20 mM, pH 7,5, que contenía cloruro sódico 150 mM y 0,05% de Tween-20). Las membranas de PVDF se incubaron con 25 ml de una dilución 1:5.000 de conjugado específico para especies marcadas con peroxidasa durante 30 min a temperatura ambiente. Las membranas de PVDF se lavaron entonces 4 veces con tampón de lavado, y se desarrollaron con 3-amino-9-etilcarbazol y peróxido de urea según suministra Zymed (San Francisco, CA) durante 10 minutos cada una.

Los resultados de una SDS-PAGE (Figura 3) muestran una proteína de aproximadamente 31 kDa purificada hasta más del 90% y que es reactiva ante un anticuerpo anti-RGS (His) mediante inmunotransferencias western (Figura 3) de la SDS-PAGE.

Inmunización de ratones con BASB041 recombinante

Se ha inyectado tres veces la proteína recombinante BASB041 parcialmente purificada en *E. coli* en ratones Balb/C en los días 0, 14 y 28 (10 animales/grupo). A los animales se les inyectaron por vía subcutánea aproximadamente 5 µg de antígeno en dos formulaciones diferentes: bien adsorbido en 100 µg de AIPO4 o bien formulado en una emulsión SBAS2 (emulsión SB62 que contiene 5 µg de MPL y 5 µg de QS21 por dosis). En el experimento también se añadió un grupo de control negativo consistente en ratones inmunizados sólo con la emulsión SBAS2. Los ratones se desangraron en los días 28 (14 días Post II) y 35 (7 días Post III) con objeto de detectar anticuerpos específicos anti-BASB041. Los anticuerpos específicos anti-BASB041 se midieron mediante inmunotransferencia western en sueros agrupados (procedentes de 10 ratones/grupo) a partir de ambas formulaciones (en el día 7 Post III únicamente), usando proteína recombinante (parte del gel) y cepas de *Neisseria meningitidis* B.

Reconocimiento de los epítomos de BASB041 en diferentes cepas del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* mediante inmunotransferencia western

En esta prueba se han probado sueros de ratones inmunizados (agrupados) mediante inmunotransferencia western para el reconocimiento de los epítomos de BASB041 en siete cepas de *Neisseria meningitidis* B: H44/76 (B:15:P1.7, 16, linaje ET-5), M97 250687 (B:4: P1.15), BZ10 (B:2b:P1.2, linaje A4), BZ198 (B: NT*: -, linaje 3), EG328 (B: NT*, linaje ST-18), NGP165 (B:2a:P1.2, agregado ET 37) y las cepas de *Neisseria meningitidis* B del ATCC 13090

(B:15:P1.15), así como en la proteína recombinante BASB041 parcialmente purificada.

(*: NT: no indicado).

En resumen, 10 µl ($> 10^8$ células/carril) de cada muestra tratada con tampón de muestra (10 min a 95°C) se ponen en un gel de gradiente de SDS-PAGE (Tris-glicina al 4-20%, Novex, código n° EC60252). La migración electroforética se produce a 125 voltios durante 90 min. A continuación las proteínas se transfieren a una lámina de nitrocelulosa (0,45 µm, código de Bio-rad n° 162-0114) a 100 voltios durante 1 hora usando un sistema Trans-blot de Bio-rad (código n° 170-3930). El filtro se bloqueó con PBS - Tween 20 al 0,05% hasta el día siguiente a temperatura ambiente antes de la incubación con el suero de los ratones que contiene los anticuerpos anti-BASB041 procedentes de ambas formulaciones de AIPO4 y SBAS2. Estos sueros se diluyen 100 veces en PBS - Tween 20 al 0,05%, y se incuban en la lámina de nitrocelulosa durante dos horas a temperatura ambiente con una agitación suave usando un sistema de mini-blotter (Miniprotean, código de Bio-rad n° 170-4017). Después de tres etapas repetidas de lavado con PBS - Tween 20 al 0,05% durante 5 min, la lámina de nitrocelulosa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave con el conjugado apropiado (anticuerpos biotinilados de oveja anti-Ig de ratón, código de Amersham n° RPN1001) diluidos a 1/500 en el mismo tampón de lavado. La membrana se lava tres veces como anteriormente, y se incuba durante 30 min con agitación usando el complejo estreptavidina-peroxidasa (código de Amersham n° 1051) diluido a 1/1 000 en el tampón de lavado. Tras las últimas tres etapas repetidas de lavado se produce el revelado durante los 20 min de tiempo de incubación en una disolución de 50 ml que contiene 30 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma), 10 ml de metanol, 40 ml de PBS y 30 µl de H₂O₂. La tinción se detiene lavando la membrana varias veces con agua destilada.

Los resultados ilustrados en las Figuras 4 y 5 muestran que todas las cepas probadas presentan las esperadas bandas alrededor de los 25-30 kDa (principal) y los 50 kDa (menor), que son reconocidas al mismo nivel en todas las cepas de *Neisseria meningitidis* B probadas. Esto significa que la proteína BASB041 probablemente se expresa en todas las cepas de *Neisseria meningitidis* B. En ambas figuras, la proteína recombinante BASB041 también es claramente reconocida por sueros de ratones con el mismo PM (segundo carril después del PM). Se sabe que otra banda a aproximadamente 20 kDa no es específica. Esta proteína BASB041 ya no es reconocida en ninguna preparación de *E. coli*.

Presencia de anticuerpos anti-BASB041 en sueros de procedentes convalecientes.

En esta prueba se han probado varios sueros de convalecientes mediante inmunotransferencia western para el reconocimiento de la proteína recombinante purificada BASB041.

En resumen, se ponen 5 µg de proteína parcialmente purificada BASB041 de *Neisseria meningitidis* B en un gel de gradiente de SDS-PAGE (4-20%, Novex, código n° EC60252) para una migración electroforética. Las proteínas se transfieren a una lámina de nitrocelulosa (0,45 µm, código de Bio-rad n° 162-0114) a 100 voltios durante 1 hora usando un sistema Trans-blot de Bio-rad (código n° 170-3930). A continuación el filtro se bloquea con PBS - Tween 20 al 0,05% hasta el día siguiente a temperatura ambiente antes de la incubación con los sueros humanos. Se probaron los siguientes sueros de convalecientes: pacientes # 262068, 261732, 262117, 261659, 261469, 261979 y 261324. Estos sueros se diluyeron 100 veces en PBS - Tween 20 al 0,05%, y se incubaron en la lámina de nitrocelulosa durante dos horas a temperatura ambiente con una agitación suave, usando un sistema de mini-blotter (Miniprotean, código de Bio-rad n° 170-4017). Después de tres etapas repetidas de lavado con PBS - Tween 20 al 0,05% durante 5 min, la lámina de nitrocelulosa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave con el conjugado apropiado (anticuerpos biotinilados de oveja anti-Ig humana, código de Amersham n° RPN1003) diluidos a 1/500 en el mismo tampón de lavado. La membrana se lava tres veces como anteriormente, y se incuba durante 30 min con agitación usando el complejo estreptavidina-peroxidasa (código de Amersham n° 1051) diluido a 1/1.000 en el tampón de lavado. Tras la última de las tres etapas de lavado se produce el revelado durante los 20 min de tiempo de incubación en una disolución de 50 ml que contiene 30 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma), 10 ml de metanol, 40 ml de agua ultra pura y 30 µl de H₂O₂. La tinción se detiene lavando la membrana varias veces con agua destilada. Los resultados ilustrados en las Figuras 6 y 7 muestran que todas las 7 convalecientes reaccionan frente a la banda principal de la proteína recombinante BASB041 a alrededor de los 25-30 kDa. Todas ellas reaccionan con aproximadamente la misma intensidad, con una reactividad ligeramente menor con los pacientes 261979. En la parte derecha de la inmunotransferencia western, se observa reacción frente a la misma banda de 25-30 kD con los sueros de ratones inmunizados, más la banda reconocida a aproximadamente 50 kDa.

Ejemplo 2

Secuenciación del ADN del gen BASB043 a partir de dos cepas de *N. meningitidis*.

A: BASB043 en la cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B ATCC13090.

El gen BASB043 de la cepa de *N. meningitidis* ATCC 13090 se muestra en la SEC ID N°: 11. La traducción de la secuencia de polinucleótidos de BASB043, mostrada en la SEC ID N°: 12, no mostró una similitud significativa con ninguna proteína conocida. El polipéptido BASB043 contiene sin embargo una característica secuencia de señalización de una lipoproteína, y por lo tanto puede insertarse en la membrana externa de la bacteria.

La secuencia del gen BASB043 fue adicionalmente confirmada como sigue. Para ese propósito se extrajo el ADN genómico a partir de 10^{10} células de las células de *N. meningitidis* (cepa ATCC 13090) usando el kit de extracción de ADN genómico de QIAGEN (Qiagen GmbH), y se sometió 1 µg de este material a una amplificación del ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores lip7-01 (5'- ATG AAA AAA TAC CTT ATC CCT CTT TCC-3') [SEC ID N°: 13] y lip7-02 (5'-TCA TTT CAA GGG CTG CAT -3') [SEC ID N°: 14]. Este producto de la PCR se purificó en gel y se sometió a una secuenciación del ADN usando el kit de secuenciación Big Dye Cycle (Perkin-Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM. La secuenciación del ADN se realizó en ambas hebras con una redundancia de 2 y la secuencia completa se ensambló usando el programa SeqMan del paquete de programas informáticos DNASTAR Lasergene. La secuencia de ADN resultante resultó ser idéntica al 100% a la SEC ID N°: 11.

B: BASB043 en la cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B H44/76.

También se determinó la secuencia del gen BASB043 en otra cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B, la cepa H44/76. Para este propósito se extrajo el ADN genómico a partir de la cepa *N. meningitidis* H44/76 usando las condiciones experimentales presentadas en el párrafo previo. Este material (1 µg) se sometió entonces a una amplificación del ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores Lip7-01 y Lip7-02 específicos para el gen BASB043. El amplicón de la PCR se sometió entonces a una secuenciación del ADN usando el kit Big Dyes (Applied biosystems) y se analizó con un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el fabricante. Como resultado, la secuencia del polinucleótido resultó ser idéntica al 100% a la SEC ID N°: 11.

Tomados conjuntamente, estos datos indican una fuerte conservación de la secuencia del gen BASB043 entre las dos cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B.

Construcción de un plásmido para expresar BASB043 recombinante

A: clonación de BASB043.

Los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* modificados en los cebadores de amplificación directo Lip7- Fm/p (5'- AGG CAG AGG CAT ATG AAA AAA TAC CTT ATC CCT CTT TCC ATT GCC -3') ([SEC ID N°: 15]) e inverso Lip7-RCf/p (5'- AGG CAG AGG CTC GAG TTT CAA GGG CTG CAT CTT CAT CAC TTC -3') ([SEC ID N°: 16]), respectivamente, permitieron la clonación direccional de un producto de PCR de BASB043 en el plásmido de expresión de *E. coli* disponible comercialmente pET24b (Novagen, EE.UU., resistente a la kanamicina) de forma que una proteína madura BASB043 podría expresarse como una proteína de fusión que contiene una etiqueta cromatográfica de afinidad (His)₆ en el C terminal. El producto de la PCR de BASB043 se purificó a partir de la reacción de amplificación usando columnas en espiral basadas en gel de sílice (QiaGen) según las instrucciones de los fabricantes. Para producir los requeridos terminales *NdeI* y *XhoI* necesarios para la clonación, el producto purificado de la PCR se digirió secuencialmente hasta su finalización con enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* según recomienda el fabricante (Life Technologies). Tras la primera digestión de restricción, el producto de la PCR se purificó a través de una columna en espiral como anteriormente para eliminar las sales y se eluyó en agua estéril antes de la segunda digestión enzimática. El fragmento de ADN digerido se purificó de nuevo usando columnas en espiral basadas en gel de sílice antes de su ligación con el plásmido pET24b.

B: producción del vector de expresión.

Para preparar el plásmido de expresión pET24b para su ligación, se digirió similarmente hasta su finalización con *NdeI* y *XhoI* y después se trató con fosfatasa intestinal bovina (*calf intestinal phosphatase*, CIP, ~0,02 unidades / pmol de extremo 5', Life Technologies) según indica el fabricante para evitar la autoligación. Se usó un exceso de aproximadamente 5 veces molar del fragmento digerido en el vector preparado para programar la reacción de ligación. Se realizó una reacción de ligación estándar de ~20 µl (~16°C, ~16 horas), usando procedimientos bien conocidos en la materia, usando ligasa de ADN T4 (~2,0 unidades / reacción, Life Technologies). Se usó una alícuota de la ligación (~5 µl) para transformar células electrocompetentes BL21 DE3 según procedimientos bien conocidos en la materia. Tras un periodo de ~2-3 horas de resultado a 37°C en ~1,0 ml de caldo LB, las células transformadas se colocaron en placas de agar LB que contenían kanamicina (50 µg/ml). El antibiótico se incluyó en el medio de selección para asegurar que todas las células transformadas portaban el plásmido pET24b (KnR). Las placas se incubaron hasta el día siguiente a 37°C durante ~16 horas. Las colonias individuales KnR se recogieron con palillos estériles y se usaron para inocular "parches" en placas nuevas LB KnR, así como ~1,0 ml de caldo de cultivo LB KnR. Tanto las placas con parches como el cultivo de caldo se incubaron hasta el día siguiente a 37°C bien en una estufa de incubación estándar (placas) o bien en un baño de agua con agitación.

Se empleó un análisis completo de PCR basado en células para verificar que los transformantes contenían el inserto de ADN BASB043. Aquí, los ~1,0 ml del cultivo de caldo LB Kn incubado hasta el día siguiente se transfirieron a un tubo de polipropileno de 1,5 ml y las células se recogieron mediante centrifugación en una microcentrifugadora Beckman (~3 min., temperatura ambiente, ~12.000 X g). El sedimento celular se suspendió en ~200 µl de agua estéril y se usó una alícuota de ~10 µl para programar una reacción de PCR con un volumen final de ~50 µl que contenía ambos cebadores de amplificación de BASB043 directo e inverso. Las concentraciones finales de los

componentes de la reacción de PCR eran esencialmente las mismas que las especificadas en el ejemplo 2, excepto porque se usaron ~5,0 unidades de polimerasa *Taq*. La etapa inicial de desnaturalización a 95°C se aumentó hasta 3 minutos para asegurar la destrucción térmica de las células bacterianas y la liberación del ADN de plásmido. Se usó un ciclador térmico ABI Modelo 9700 y un perfil de 32 ciclos de amplificación térmica de tres etapas, es decir, a 95°C, 45 s; a 55-58°C, 45 s, a 72°C, 1 min., para amplificar el fragmento de PCR de BASB043 a partir de las muestras transformantes lisadas. Tras la amplificación térmica se analizó una alícuota de la reacción de ~20 µl mediante una electroforesis en gel de agarosa (0,8% de agarosa en un tampón de Tris-acetato-EDTA (TAE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante una iluminación UV tras la electroforesis en gel y una tinción con bromuro de etidio. Se electroforetizó un estándar de tamaño molecular de ADN (escalera de 1 Kb, Life Technologies) en paralelo con las muestras de prueba, y se usó para estimar el tamaño de los productos de la PCR. Los transformantes que produjeron el producto esperado de la PCR se identificaron como cepas que contenían un constructo de expresión de BASB043. Las cepas que contenían el plásmido de expresión se analizaron entonces para comprobar la expresión inducible del BASB043 recombinante.

C: análisis de la expresión de los transformantes positivos en la PCR.

Por cada transformante positivo en la PCR identificado anteriormente, se inocularon ~5,0 ml de caldo LB que contenía kanamicina (50 µg/ml) con células procedentes de las placas con parches y se hicieron crecer hasta el día siguiente a 37°C con agitación (~250 rpm). Se inoculó una alícuota del cultivo de siembra crecido hasta el día siguiente (~1,0 ml) en un matraz erlenmeyer de 125 ml que contenía ~25 ml de caldo LB Kn y se hizo crecer a 37°C con agitación (~250 rpm) hasta que la turbidez del cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de ~0,5, es decir, una fase semilogarítmica (habitualmente aproximadamente 1,5 – 2,0 horas). En ese momento se transfirió aproximadamente la mitad del cultivo (~12,5 ml) a un segundo matraz de 125 ml y se indujo la expresión de la proteína BASB043 recombinante mediante la adición de IPTG (disolución madre 1,0 M preparada en agua estéril, Sigma) hasta una concentración final de 1,0 mM. La incubación de ambos cultivos inducido y no inducido por IPTG continuó durante ~4 horas adicionales a 37°C con agitación. Las muestras de ambos cultivos (~1,0 ml) inducido y no inducido se retiraron tras el periodo de inducción, y las células se recogieron por centrifugación en una microcentrifugadora a temperatura ambiente durante ~3 minutos. Los sedimentos celulares individuales se suspendieron en ~5 µl de agua estéril y después se mezclaron con un volumen igual de tampón de muestra 2X Laemmli SDS-PAGE que contenía 2-mercaptoetanol, y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante ~3 min para desnaturalizar las proteínas. Se cargaron volúmenes iguales (~15 µl) de ambos lisados celulares brutos inducido y no inducido con IPTG por duplicado en gel de poliacrilamida Tris/glicina al 12% (mini geles de 1 mm de espesor, Novex). Las muestras de lisados inducida y no inducida se electroforetizaron junto con marcadores de peso molecular teñidos previamente (SeeBlue, Novex) en condiciones convencionales usando un tampón estándar de desarrollo de SDS/Tris/glicina (BioRad). Después de la electroforesis, un gel se tiñó con azul brillante de comassie R250 (BioRad) y después se destiñó para visualizar la(s) nueva(s) proteína(s) inducible(s) por IPTG BASB043. El segundo gel se inmunoelectrofretizó en una membrana de PVDF (0,45 micrómetros de tamaño de poro, Novex) durante ~2 h a 4°C usando un aparato de inmunoelectroforesis BioRad Mini-Protean II y tampón de transferencia de metanol de Towbin (20%). El bloqueo de las incubaciones de membrana y anticuerpos se realizó según procedimientos bien conocidos en la materia. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-RGS (His), seguido de un segundo anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con HRP (QiaGen) para confirmar la expresión y la identidad de la proteína recombinante BASB03. La visualización del patrón reactivo de anticuerpo anti-His se realizó usando bien un sustrato insoluble ABT o bien usando Hyperfilm con el sistema quimioluminiscencia de Amersham ECL.

Producción de BASB043 Recombinante

Cepa bacteriana

Se usó una cepa de expresión recombinante de *E. coli* BL21 DE3 que contenía un plásmido pET24b que codificaba para BASB043 de *N. meningitidis* para producir una masa celular para la purificación de la proteína recombinante. La cepa de expresión se cultivó en placas de agar LB que contenían 50 µg/ml de kanamicina ("Kn") para asegurar el mantenimiento de plásmido. Para su crioconservación a -80°C, la cepa se propagó en caldo LB que contenía la misma concentración de antibiótico, y después se mezcló con un volumen igual de caldo LB que contenía un 30% (p/v) de glicerol.

Medios

El medio de fermentación usado para la producción de la proteína recombinante consistía en 2X caldo YT (Difco) que contenía 50 µg/ml de Kn. Se añadió antiespumante al medio para el fermentador a 0,25 ml/L (Antifoam 204, Sigma). Para inducir la expresión de la proteína recombinante BASB043 se añadió IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) al fermentador (1 mM, final).

Fermentación

Se inoculó un matraz erlenmeyer de siembra de 500 ml que contenía 50 ml de volumen de trabajo con 0,3 ml de cultivo congelado descongelado rápidamente, o varias colonias procedentes de un cultivo en placa de agar selectivo, y se incubaron durante aproximadamente 12 horas a 37 ± 1°C en una plataforma de agitación a 150 rpm (Innova

2100, New Brunswick Scientific). Este cultivo de siembra se usó entonces para inocular un fermentador de 5 L de volumen de trabajo que contenía 2X caldo YT y ambos antibióticos Kn. El fermentador (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific) operaba a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, a 0,2 – 0,4 VVM de inyección de aire, a 250 rpm en turbinas Rushton. El pH no se controló ni en el cultivo de siembra en matraz ni en el fermentador. Durante la fermentación, el pH varió entre 6,5 y 7,3 en el fermentador. Se añadió IPTG (disolución madre 1,0 M preparada en agua estéril) al fermentador cuando el cultivo alcanzó un crecimiento semilogarítmico ($\sim 0,7$ unidades a D.O.₆₀₀). Las células se indujeron durante 2 - 4 horas y después se recogieron mediante centrifugación usando una centrífuga de alta velocidad 28RS Heraeus (Sepatech) o RC5C (Sorvall Instruments). La pasta celular se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Purificación

El imidazol y los reactivos de calidad biotecnológica o superior se obtuvieron todos en Ameresco Chemical, Solon, Ohio. Los Triton X-100 (t-Octilfenoxipolietoxi-etanol), Triton X-114, fosfato sódico monobásico y urea tenían calidad analítica o superior y se obtuvieron en Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri. La disolución salina tamponada con fosfato Xholne (1x PBS) se obtuvo en Quality Biological, Inc., Gaithersburg, Maryland. La disolución salina tamponada con fosfato Xholne (10x PBS) se obtuvo en BioWhittaker, Walkersville, Maryland. El anticuerpo Penta-His exento de BSA se obtuvo en QiaGen, Valencia, California. La IgG de cabra antirratón conjugada con peroxidasa AffiniPure se obtuvo en Jackson Immuno Research, West Grove, Penn. Todos los demás reactivos químicos tenían calidad analítica o superior.

La resina quelante de Ni de flujo rápido de Sepharose se obtuvo en Pharmacia, Suecia. La tris-glicina al 4-20% y los geles de poliacrilamida al 10-20% prefabricados, todos los tampones de desarrollo y disoluciones, los estándares preteñidos SeeBlue, los estándares MultiMark Multi Colored y las membranas de transferencia de PVDF se obtuvieron en Novex, San Diego, California. Los kits de tinción con plata SDS-PAGE se obtuvieron en Daiichi Pure Chemicals Company Limited, Tokio, Japón. La disolución de tinción de Coomassie se obtuvo en Bio-Rad Laboratories, Hercules, California. Los filtros de jeringa Acrodisc® PF de 0,2 µm se obtuvieron en Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan. Los filtros de jeringas desechables GD/X de 25 mm se obtuvieron en Whatman Inc., Clifton, Nueva Jersey. El tubo de diálisis de 8.000 MWCO se obtuvo en BioDesign Inc. Od New York, Carmal Nueva York. Los reactivos de ensayo de la proteína BCA y los tubos de diálisis de piel de serpiente de 3.500 MWCO se obtuvieron en Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois.

Protocolo de extracción

La pasta celular se descongeló a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos. Se pesaron entre cinco y seis gramos de material en un tubo de centrifuga desechable de 50 ml. El antígeno recombinante BASB043 se purificó mediante extracción de las membranas celulares con Tris-HCl 25 mM que contenía guanidina-HCl 4 M. El sobrenadante se aplicó a un flujo rápido de Sepharose quelante de níquel. La proteína se eluye a continuación con imidazol 200 mM para purificar por afinidad la proteína marcada con histidina, y rindió más del 90% de proteína pura.

Unión de BASB043 a una resina de afinidad de níquel

Tras la extracción, la mezcla se incubó en el quelante de níquel de flujo rápido de Sepharose y se dejó a temperatura ambiente con una agitación suave durante una hora. Después de una hora, el quelante de níquel de flujo rápido de Sepharose se prepara en una columna XK16 de Pharmacia, y a continuación se eluye con tampón de imidazol 200 mM para purificar por afinidad la proteína marcada con histidina, y rindió más del 90% de proteína pura. La fracción se dializó frente a PBS (pH 7,4) que contenía un 0,1% de Triton y se almacenó a -70°C a una concentración de 500 µg/ml.

Formulación final

BASB043 se formuló mediante diálisis hasta el día siguiente frente a tres cambios de Triton X-100 al 0,1% y 1x PBS, pH 7,4. La proteína purificada se caracterizó y usos para producir anticuerpos, según se describe a continuación.

Caracterizaciones bioquímicas: SDS-PAGE y análisis por inmunotransferencia Western

La proteína purificada recombinante se resolvió en geles de poliacrilamida al 4-20% y se transfirió electroforéticamente a membranas de PVDF a 100 V durante 1 hora según se describió previamente (Thebaine y col. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 76: 4350-4354). Entonces las membranas de PVDF se pretrataron con 25 ml de disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco Xholne que contenía un 5% de leche en polvo desnatada. Todas las incubaciones subsiguientes se llevaron a cabo usando este tampón de pretratamiento.

Las membranas de PVDF se incubaron con una dilución de anticuerpos con colas anti-His durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas de PVDF se lavaron entonces dos veces con tampón de lavado (tampón Tris 20 mM, pH 7,5, que contenía cloruro sódico 150 mM y 0,05% de Tween-20). Las membranas de PVDF se incubaron con 25 ml de una dilución 1:5.000 de conjugado específico para especies marcadas con peroxidasa durante 30 min a temperatura ambiente. Las membranas de PVDF se lavaron entonces 4 veces con tampón de lavado, y se desarrollaron con 3-amino-9-etilcarbazol y peróxido de urea según suministra Zymed (San Francisco, CA) durante 10 minutos cada una.

Los resultados de una SDS-PAGE (Figura 8) muestran una proteína de aproximadamente 16 kDa purificada hasta más del 90% y que es reactiva ante un anticuerpo anti-RGS (His) mediante inmunotransferencias western (Figura 8) de la SDS-PAGE.

Inmunización de ratones con BASB043 recombinante

Se ha inyectado tres veces la proteína recombinante BASB043 parcialmente purificada en *E. coli* en ratones Balb/C en los días 0, 14 y 28 (10 animales/grupo). A los animales se les inyectaron por vía subcutánea aproximadamente 5 µg de antígeno en dos formulaciones diferentes: bien adsorbido en 100 µg de AIPO4 o bien formulado en una emulsión SBAS2 (emulsión SB62 que contiene 5 µg de MPL y 5 µg de QS21 por dosis). En el experimento también se añadió un grupo de control negativo consistente en ratones inmunizados sólo con la emulsión SBAS2. Los ratones se desangraron en los días 28 (14 días Post II) y 35 (7 días Post III) con objeto de detectar anticuerpos específicos anti-BASB043. Los anticuerpos específicos anti-BASB043 se midieron mediante inmunotransferencia western en sueros agrupados (procedentes de 10 ratones/grupo) a partir de ambas formulaciones (en el día 7 Post III únicamente), usando proteína recombinante (parte del gel) y cepas de *Neisseria meningitidis* B.

Reconocimiento de los epítomos de BASB043 en diferentes cepas de *Neisseria meningitidis* B mediante inmunotransferencia western

En esta prueba se han probado sueros de ratones inmunizados (agrupados) mediante inmunotransferencia western para el reconocimiento de los epítomos de BASB043 en siete cepas de *Neisseria meningitidis* B: H44/76 (B:15:P1.7, 16, linaje ET-5), M97 250687 (B:4: P1.15), BZ10 (B:2b:P1.2, linaje A4), BZ198 (B: NT*: -, linaje 3), EG328 (B: NT*, linaje ST-18), NGP165 (B:2a:P1.2, agregado ET 37) y las cepas de *Neisseria meningitidis* B del ATCC 13090 (B:15:P1.15), así como en proteína recombinante BASB043 parcialmente purificada.

(*: NT: no indicado).

En resumen, 10 µl ($> 10^8$ células/carril) de cada muestra tratada con tampón de muestra (10 min a 95°C) se ponen en un gel de gradiente de SDS-PAGE (Tris-glicina al 4-20%, Novex, código n° EC60252). La migración electroforética se produce a 125 voltios durante 90 min. A continuación las proteínas se transfieren a una lámina de nitrocelulosa (0,45 µm, código de Bio-rad n° 162-0114) a 100 voltios durante 1 hora usando un sistema Trans-blot de Bio-rad (código n° 170-3930). El filtro se bloqueó con PBS - Tween 20 al 0,05% hasta el día siguiente a temperatura ambiente antes de la incubación con el suero de los ratones que contiene los anticuerpos anti-BASB043 procedentes de ambas formulaciones AIPO4 y SBAS2. Estos sueros se diluyen 100 veces en PBS - Tween 20 al 0,05%, y se incuban en la lámina de nitrocelulosa durante dos horas a temperatura ambiente con una agitación suave usando un sistema de mini-blotter (Miniprotean, código de Bio-rad n° 170-4017). Después de tres etapas repetidas de lavado con PBS - Tween 20 al 0,05% durante 5 min, la lámina de nitrocelulosa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave con el conjugado apropiado (anticuerpos biotinilados de oveja anti-Ig de ratón, código de Amersham n° RPN1001) diluidos a 1/500 en el mismo tampón de lavado. La membrana se lava tres veces como anteriormente, y se incuba durante 30 min con agitación usando el complejo estreptavidina-peroxidasa (código de Amersham n° 1051) diluido a 1/1.000 en el tampón de lavado. Tras las últimas tres etapas repetidas de lavado se produce el revelado durante los 20 min de tiempo de incubación en una disolución de 50 ml que contiene 30 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma), 10 ml de metanol, 40 ml de PBS y 30 µl de H₂O₂. La tinción se detiene lavando la membrana varias veces con agua destilada.

Los resultados ilustrados en las Figuras 9 y 10 muestran que todas las cepas probadas presentan las esperadas bandas alrededor de los 20 kDa (principal) y los 25 y 35-40 kDa (menores), que son reconocidas al mismo nivel en todas las cepas de *Neisseria meningitidis* B probadas. Esto significa que la proteína BASB043 probablemente se expresa en todas las cepas de *Neisseria meningitidis* B. En ambas figuras, la proteína recombinante BASB043 también es claramente reconocida por sueros de ratones con el mismo PM (segundo carril después del PM). Esta proteína BASB043 ya no es reconocida en ninguna preparación de *E. coli*.

Presencia de anticuerpos anti-BASB043 en sueros de procedentes convalecientes.

En esta prueba se han probado varios sueros de convalecientes mediante inmunotransferencia western para el reconocimiento de la proteína recombinante purificada BASB043.

En resumen, se ponen 5 µg de proteína parcialmente purificada BASB043 de *Neisseria meningitidis* B en un gel de gradiente de SDS-PAGE (4-20%, Novex, código n° EC60252) para una migración electroforética. Las proteínas se transfieren a una lámina de nitrocelulosa (0,45 µm, código de Bio-rad n° 162-0114) a 100 voltios durante 1 hora usando un sistema Trans-blot de Bio-rad (código n° 170-3930). A continuación el filtro se bloquea con PBS - Tween 20 al 0,05% hasta el día siguiente a temperatura ambiente antes de la incubación con los sueros humanos. Se probaron los siguientes sueros de convalecientes: pacientes # 261469, 261979, 261324, 261732, 262117 y 261659. Estos sueros se diluyeron 100 veces en PBS - Tween 20 al 0,05%, y se incubaron en la lámina de nitrocelulosa durante dos horas a temperatura ambiente con una agitación suave, usando un sistema de mini-blotter (Miniprotean, código de Bio-rad n° 170-4017). Después de tres etapas repetidas de lavado con PBS - Tween 20 al 0,05% durante 5 min, la lámina de nitrocelulosa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave con el conjugado apropiado (anticuerpos biotinilados de oveja anti-Ig humana, código de Amersham n° RPN1003) diluidos

a 1/500 en el mismo tampón de lavado. La membrana se lava tres veces como anteriormente, y se incuba durante 30 min con agitación usando el complejo estreptavidina-peroxidasa (código de Amersham n° 1051) diluido a 1/1.000 en el tampón de lavado. Tras las últimas tres etapas repetidas de lavado se produce el revelado durante los 20 min de tiempo de incubación en una disolución de 50 ml que contiene 30 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma), 10 ml de metanol, 40 ml de agua ultra pura y 30 µl de H₂O₂. La tinción se detiene lavando la membrana varias veces con agua destilada. Los resultados ilustrados en las Figuras 11 y 12 muestran que todas las 6 convalecientes reaccionan frente a la banda principal de la proteína recombinante BASB043 a alrededor de los 20 kDa. Los sueros humanos sólo reconocen esta banda, mientras que los sueros de ratones se reconocen las tres bandas principales de BASB043. Todas estas convalecientes humanas reaccionan con una intensidad muy alta, excepto la convaleciente n° 262117, que muestra una reactividad menor. En la parte derecha de la inmunotransferencia western, se observa reacción frente a la misma la banda de 25-30 kD con los sueros de ratones inmunizados, más la banda reconocida a aproximadamente 50 kDa. También se observan unas pocas bandas a PM menores. También son visibles unas pocas pérdidas en la Figura 11.

Ejemplo 3

Secuenciación del ADN del gen BASB044 a partir de dos cepas de *N. meningitidis*.

A: BASB044 en la cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B ATCC13090.

El gen BASB044 de la cepa de *N. meningitidis* ATCC 13090 se muestra en la SEC ID N°: 17. La traducción de la secuencia de polinucleótidos de BASB044, mostrada en la SEC ID N°: 18, muestra una similitud significativa (identidad del 25% en una superposición de 425 residuos) con la proteína de transporte de ácidos grasos de cadena larga de *E. coli* FadL.

La secuencia del gen BASB044 fue adicionalmente confirmada como sigue. Para ese propósito se extrajo el ADN genómico a partir de 10¹⁰ células de las células de *N. meningitidis* (cepa ATCC 13090) usando el kit de extracción de ADN genómico de QIAGEN (Qiagen GmbH), y se sometió 1 µg de este material a una amplificación del ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores FadL 17 (5' TGA GTG GAA AAT GCC GTC TGA AGT-3') [SEC ID N°: 21] y FadL-18 (5' TGC ACC CCG TCA TTC CTG TCT-3') [SEC ID N°: 22]. Este producto de la PCR se purificó en gel y se sometió a una secuenciación del ADN usando el kit de secuenciación Big Dye Cycle (Perkin-Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM. La secuenciación del ADN se realizó en ambas hebras con una redundancia de 2 y la secuencia completa se ensambló usando el programa SeqMan del paquete de programas informáticos DNASTAR Lasergene. La secuencia de ADN resultante resultó ser idéntica al 100% a la SEC ID N°: 17.

B: BASB044 en la cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B H44/76.

También se determinó la secuencia del gen BASB044 en otra cepa de *N. meningitidis* del serogrupo B, la cepa H44/76. Para este propósito se extrajo el ADN genómico a partir de la cepa *N. meningitidis* H44/76 usando las condiciones experimentales presentadas en el párrafo previo. Este material (1 µg) se sometió entonces a una amplificación del ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores FadL-01 (5' CAT AGC ACC ATG GCC GGC TAC CAC TTC G - 3') [SEC ID N°: 23] y FadL-02 (5' CTA GTC TAG ATT ATT TGA ATT TGT AGG TGT AT - 3') [SEC ID N°: 24] específicos para esa parte del gen BASB044 que codifica para la proteína madura, asumiendo que la proteína madura comenzaría en el aminoácido número 25 de la SEC ID N°: 18. El amplicón de la PCR se sometió entonces a una secuenciación del ADN usando el kit Big Dyes (Applied biosystems) y se analizó con un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el fabricante. Como resultado, se obtuvieron las secuencias del polinucleótido y del polipéptido deducido, denominadas como SEC ID N°: 19 e SEC ID N°: 20, respectivamente. Usando el programa MegAlign del paquete de programas informáticos DNASTAR Lasergene, se realizó una alineación de las secuencias de los polinucleótidos de las SEC ID N°: 17 y 19, y se muestra en la Figura 13; su nivel de identidad asciende al 99,6%. Usando el mismo programa MegAlign se realizó una alineación de las secuencias de los polinucleótidos de las SEC ID N°: 18 y 20, y se muestra en la Figura 14; su nivel de identidad asciende al 99,8%.

Tomados conjuntamente, estos datos indican una fuerte conservación de la secuencia del gen BASB044 entre las dos cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B.

Ejemplo 4

El gen BASB048 en la cepa de *N. meningitidis* ATCC 13090.

El gen BASB048 de la cepa de *N. meningitidis* ATCC 13090 se muestra en la SEC ID N°: 25. La traducción de la secuencia de polinucleótidos de BASB048, mostrada en la SEC ID N°: 26, muestra una similitud significativa (identidad del 27% en una superposición de 429 residuos) con un componente de la membrana externa exportador de ABC de *Serratia marcescens*, así como con otros miembros de la familia de proteínas TolC. El polipéptido BASB048 contiene una secuencia de señalización líder, según predijo el programa Spscan del paquete de programas informáticos GCG.

La secuencia de señalización predicha se escindiría después del residuo Ala58. Entonces, BASB048 es una proteína de membrana, una proteína superficial o una proteína secretada.

Secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas

SEC ID Nº: 1

5 Secuencia polinucleotídica de *Neisseria meningitidis* BASB041 de la cepa ATCC 13090

ATGAAAACCGTTTCCACCGCCGTTGTCCTTGCCGCCGCTGCCGTTTCACTGACCGGCTGTGCGACCGAATCCTCACGCAG
TCTCGAGGTAGAGAAAGTCGCCTCCTACAATACGCAATACCACGGCGTGCGTACCCCGATTTCGTCGGAACATTTCGACA
ACCGCTCCAGCTTCCAAAAAGGCATTTTCTCCGACGGGGAAGACCGTTTGGGCAGCCAGGCAAAAACCATTTCTGGTAACG
CACCTGCAACAGACCAACCGCTTCAACGTACTGAACCGCACCAATTTGAACGCATTAAACAGGAATCCGGCATTTCCGG
CAAAGCGCATAACCTGAAAGGCGCAGATTATGTCGTTACTGGCGATGTAACCGAATTCGGACGCAGAGATGTCGGCGATC
ATCAGCTCTTCGGCATTTTGGGTCGCGGCAAATCGCAAATCGCCTATGCAAAGTGGCTCTGAATATCGTCAACGTCAAT
ACTTCCGAAATCGTCTATTCCGCACAGGGCGCGGGCGAATACGCACTTTCCAACCGTGAAATCATCGGTTTCGGCGGCAC
TTCCGGCTACGATGCGACTTTGAACGGCAAAGTTTGTAGACTTGGCAATCCGCGAACCGTCAACAGCCTGGTTTCAGGCTGT
TGACAACGGCGCATGGCAACCAACCGTTAA

SEC ID Nº: 2

Secuencia polipeptídica de *Neisseria meningitidis* BASB041 deducida a partir de la secuencia polinucleotídica de la SEC ID Nº: 1

MKTVSTAVVLA AAAVSLTG CATESSRSL EVEKVAS YNTQYHGVRTPI SVGTFDNRSSFQK GIFSDGEDRLGSQAKTILVT
HLQQTNRFNVLNRTNLNALKQESGISGKAHNLKGADYVVTGVDVTEFGRRDVGDHQLFGILGRGKSQIAYAKVALNIVNVN
TSEIVYSAQGAGEYALS NREIIGFGGTSGYDATLNGKVLDLAIREPSTAWFRLLTTAHGNPTV

SEC ID Nº: 3

Secuencia polinucleotídica de *Neisseria meningitidis* BASB041 de la cepa ATCC 13090

ATGAAAACCGTTTCCACCGCCGTTGTCCTTGCCGCCGCTGCCGTTTCACTGACCGGCTGTGCGACCGAATCCTCACGCAG
TCTCGAGGTAGAGAAAGTCGCCTCCTACAATACGCAATACCACGGCGTGCGTACCCCGATTTCGTCGGAACATTTCGACA
ACCGCTCCAGCTTCCAAAAAGGCATTTTCTCCGACGGGGAAGACCGTTTGGGCAGCCAGGCAAAAACCATTTCTGGTAACG
CACCTGCAACAGACCAACCGCTTCAACGTACTGAACCGCACCAATTTGAACGCATTAAACAGGAATCCGGCATTTCCGG
CAAAGCGCATAACCTGAAAGGCGCAGATTATGTCGTTACTGGCGATGTAACCGAATTCGGACGCAGAGATGTCGGCGATC
ATCAGCTCTTCGGCATTTTGGGTCGCGGCAAATCGCAAATCGCCTATGCAAAGTGGCTCTGAATATCGTCAACGTCAAT
ACTTCCGAAATCGTCTATTCCGCACAGGGCGCGGGCGAATACGCACTTTCCAACCGTGAAATCATCGGTTTCGGCGGCAC
TTCCGGCTACGATGCGACTTTGAACGGCAAAGTTTGTAGACTTGGCAATCCGCGAAGCCGTCAACAGCCTGGTTTCAGGCTG
TTGACAACGGCGCATGGCAACCAACCGTTAA

SEC ID Nº: 4

15 Secuencia polipeptídica de *Neisseria meningitidis* BASB041 deducida a partir de la secuencia polinucleotídica de la SEC ID Nº: 3

MKTVSTAVVLA AAAVSLTG CATESSRSL EVEKVAS YNTQYHGVRTPI SVGTFDNRSSFQK GIFSDGEDRLGSQAKTILVT
HLQQTNRFNVLNRTNLNALKQESGISGKAHNLKGADYVVTGVDVTEFGRRDVGDHQLFGILGRGKSQIAYAKVALNIVNVN
TSEIVYSAQGAGEYALS NREIIGFGGTSGYDATLNGKVLDLAIREAVNSLVQAVDNGAWQPNR

SEC ID Nº: 5

Secuencia polinucleotídica de *Neisseria meningitidis* BASB041 de la cepa H44/76

ATGAAAACCGTTTCCACCGCCGTTGTCCTTGCCGCCGCTGCCGTTTCACTGACCGGCTGTGCGACCGAATCCTCACGCAG
TCTCGAGGTAGAGAAAGTCGCCTCTACAATACGCAATATCACGGTGTTCGTACCCCGATTTCCTGCGGAACATTTCGACA
ACCGCTCCAGCTTCCAAAAGGCATTTTCTCCGACGGGGAAGACCGTTTGGGCAGCCAGGCAAAAACCATTCTAGTAACG
CACCTGCAACAGACCAACCGCTTCAACGTACTGAACCGCACCAATTTGAACGCATTAAACAGGAATCCGGCATTTCGGG
CAAAGCGCATAACCTGAAAGGCGCAGATTATGTCGTTACCGGCGATGTAACCGAATTCCGACGCAGAGATGTCGGCGATC
ATCAGCTCTTCGGCATTTTGGGTGCGGCAAATCGCAAATCGCCTATGCAAAGTGGCTCTGAATATCGTCAACGTCAAT
ACTTCCGAAATCGTCTATTCCGCACAGGGCGCGGGCGAATACGCACCTTCCAACCGTGAAATCATCGGTTTCGGCGGCAC
TTCCGGCTACGATGCGACTTTGAACGGCAAAGTTTTAGACTTGGCAATCCGCGAAGCCGTCAACAGCCTGGTTCAGGCTG
TTGACAACGGCGCATGGCAACCCAACCGTTAA

SEC ID Nº: 6

Secuencia polipeptídica de *Neisseria meningitidis* BASB041 deducida a partir de la secuencia polinucleotídica de la SEC ID Nº: 5

MKTVSTAVVLAAAVSLTGCATESSRSLEVEKVASYNTQYHGVRTPIISVGTFDNRSSFQKGIFSDGEDRLGSQAKTILVT
HLQQTNRFNVLNRTNLNALKQESGISGKAHNLKGADYVVTGDVTEFGRRDVGDHQLFGILGRGKSQIAYAKVALNIVNVN
TSEIVYSAQGAGEYALSNREIIGFGGTSGYDATLNGKVLDLAIREAVNSLVQAVDNGAWQPNR

SEC ID Nº: 7

AAT GAA AAC CGT TTC CAC CGC

SEC ID Nº: 8

TCA TTT CTC CTT AAC GGT

SEC ID Nº: 9

AGG CAG AGG CAT ATG AAA ACC GTT TCC ACC GCC GTT GTC CTT GC

SEC ID Nº: 10

AGG CAG AGG GTC GAC TTT CTC CTT AAC GGT TGG GTT GCC ATG CGC

SEC ID Nº: 11

Secuencia polinucleotídica de *Neisseria meningitidis* BASB043 de la cepa ATCC 13090

ATGAAAAAATACCTTATCCCTCTTTCCATTGCGGCAGTTCTTTCCGGCTGCCAGTCTATTTATGTGCCACATTGACGGA
AATCCCCGTGAATCCTATCAATACCGTCAAAACGGAAGCACCTGCAAAGGTTTCCGCCTTGCTCTTCGCATTGGACGG
ATGTTGCCAAAATCAGCGATGAAGCGACGCGCTTGGGCTATCAGGTGGGTATCGGTAAATGACCAAGGTTCAGGCGGCG
CAATATCTGAACAACTTCAGAAAACGCCTGGTCCGACGCAATGCCGTCGATGACAGTATGTATGAAATCTACCTGCGTTC
GGCGATAGACAGCCAGCGGGGCGCAATCAATACGGAACAGTCCAAGCTGTATATCCAGAATGCCTTGCGCGGCTGGCAGC
AGCGTTGGAATAATATGGATGTCAAACCCAACAACCCCGCATTTACCAACTTTTTGATGGAAGTGATGAAGATGCAGCCC
TTGAAATGA

SEC ID Nº: 12

Secuencia polipeptídica de *Neisseria meningitidis* BASB043 deducida a partir de la secuencia polinucleotídica de la SEC ID Nº: 11

MKKYLIPLSIAAVLSGCQSIYVPTLTEIPVNPINTVKTEAPAKGFRLASSHWTDVAKISDEATRLGYQVGIGKMTKVQAA
QYLNNFRKRLVGRNAVDDSMYEIYLRSAIDSQRGAINTEQSKLYIQNALRGWQQRWKNMDVKPNNPAFTNFLMEVMKMQP
LK

SEC ID Nº: 13

ATG AAA AAA TAC CTT ATC CCT CTT TCC

SEC ID Nº: 14

TCA TTT CAA GGG CTG CAT

SEC ID Nº: 15

AGG CAG AGG CAT ATG AAA AAA TAC CTT ATC CCT CTT TCC ATT GCC

SEC ID Nº: 16

AGG CAG AGG CTC GAG TTT CAA GGG CTG CAT CTT CAT CAC TTC

SEC ID Nº: 17

Secuencia polinucleotídica de *Neisseria meningitidis* BASB044 de la cepa ATCC 13090

ATGACCCCTTCCGCACTGAAAAAACCGTCCTGCTGCTCGGCACTGCCTTTGCCGCCGCATCCGCACAAGCCTCCGGCTA
CCACTTCGGCACACAGTCGGTCAACGCGCAAAGCACGGCAAATGCCGCCGCCGAGAAGCCGCCGACGCATCGACCATCT
TCTACAACCCTGCCGGCCTGACCAAACTCGACAGCAGCCAGATTTCGGTCAACGCCAACATCGTGCTGCCAGCATTCAT
TATGAGGCGGATTCCGCCACCGACTTTACCGGGCTTCCCGTCCAAGGTTGAAAAGCGGCAAAATCACAAAACACCGGT
CGCGCCCCACATCTACGGCGCATACAAAGTCAACGACAATCTGACCGTAGGCTTGGGCGTGACGTCCCCCTTCGGTTCTG
CCACCGAATACGAAAAAGATTCCGTGTTGCGCCACAACATCAACAACTCGGTCTGACCAGCATCGCCGTGAACTGTC
GCCGCGTGGAACTCAACGACCGCCATTCTTCGGCGCAGGCATCATCGCCCAACATACTTCCGCCGAATGCGCAAATA
TGCCGACTGGGGGATTAAGAGTAAAGCAGAGATATTGACGGCAAACCGCCCAAACCTAACGGTGTAGCCGAAGCTGCAA
AAATTCAGGCCGACGGACACGCCGATGTCAAAGGCAGCGATTGGGGCTTCGGCTACCAACTGGCGTGATGTGGGACATC
AACGACCGTGCGCGCGTGGGCGTGAACCTACCGTTCCAAAGTCTCGCACACGCTCAAAGGCGATGCCGAATGGGCGGCAGA
CGGCGCGCGCGGAAAGCAATGTGGAGTACGATGCTTGACGCAAACGGCTACACGGCGAATGAAAAGCCCGCGTTAAAA
TCGTTACGCCTGAGTCTTTGTCCGTACACGGTATGTACAAAGTGTCCGATAAAGCCGACCTGTTCGGCGACGTAACCTGG
ACGCGCCACAGCCGCTTCGATAAGGCGGAACTGGTTTTTGAAAAAGAAAAACCGTCGTCAAAGGCAAATCCGACCGCAC
CACCATCACCCCCAACTGGCGCAACACCTACAAAGTCGGCTTCGGCGGTTCTTATCAAATCAGCGAACCGCTGCAACTGC
GCGCCGGCATCGCTTTTGACAAATCGCCGTCCGCAACGCGGACTACCGCATGAACAGCCTGCCCGACGGCAACCGCATC
TGGTTCTCCGCCGGTATGAAATACCATATCGGTAAAAACCGTCGTGATGCCGCTACACCCACATCCACATCAACGA
CACCACCTACCGCACGGCGAAGGCAAGCGCAACGATGTGGACAGCAAAGGCGCGTCTTCCGCACGTTTCAAAAACCACG
CCGACATCATCGGCCTGCAATACACCTACAAATTCAAATAA

SEC ID Nº: 18

Secuencia polipeptídica de *Neisseria meningitidis* BASB044 deducida a partir de la secuencia polinucleotídica de la
SEC ID Nº: 17

MTPSALKKTVLLLGTAFAAASAQASGYHFGTQSVNAQSTANAAAAEADASTIFYNPAGLTKLDSSQISVNANIVLPSIH
YEADSATDFTGLPVQGSKSGKITKTTVAPHIYGAYKVNDNLTVGLGVYVPFGSATEYEKDSVLRHNINKLGLTSIAVEPV
AAWKLNDRHSGAGIIAQHTSAELRKYADWGIKSKAEILTAKPPKPNGVAEAAKIQADGHADVKGSDWGFYQLAWMWDI
NDRARVGVNYRSKVSHTLKGDAEWAADGAAAKAMWSTMLAANGYTANEKARVKIVTPESLSVHGMVKVSDKADLFGDVTW
TRHSRFDKAELVFEKEKTVVKGKSDRTTITPNWRNTYKVGFGGSYQISEPLQLRAGIAFDKSPVRNADYRMNSLPDGNRI
WFSAGMKYHIGKNHVDAAYTHIHINDTTYRTAKASGNDVDSKGASSARFKNHADIIGLQYTYKFK

SEC ID Nº: 19

Secuencia polinucleotídica de *Neisseria meningitidis* BASB044 de la cepa H44/76

TCCGGCTACCACTTCGGCACACAGTCCGTCAACGCGCAAAGCACGGCAAATGCCGCCGCCGAGAAGCCGCCGACGCATC
GACCATCTTCTACAACCCCTGCCGGCCTGACCAAACCTGCACAGCAGCCAGATTTCCGTCAACGCCAACATCGTGCTGCCCA
GCATTCAATTATGAGGCGGATTCCGCCACCGACTTTACCGGGCTTCCCGTCCAAGGTTGAAAAGCGGCAAATCACAAA
ACCACGGTCGCGCCCCACATCTACGGCGCATACAAAGTCAACGACAATCTGACCGTGGGCTTGGGCGTGACGTCCCCCTT
CGGCTCTGCCACCGAATACGAAAAAGATTCCGTGTGCGCCACAACATCAACAACTCGGTCTGACCAGCATCGCCGTG
AACCTGTGCGCGCGTGGAACCTCAACGACCGCCATTCTTTCGGCGCAGGCATCATCGCCCAACATACTTCCGCCGAACTG
CGCAAATATGCCGACTGGGGGATTAAGAGTAAAGCAGAGATATTGACGGCAAAACCGCCCAAACCTAACGGTGTAGCCGA
AGCTGCAAAAATTGAGGCCGACGACACGCGGATGTCAAAGGCAGCGATTGGGGCTTCCGCTACCAACTGGCGTGATGT
GGGACATCAACGACCGTGCGCGCGTGGGCGTGAACCTACCGTTCCAAAGTCTCGCACACGCTCAAAGGCGATGCCGAATGG
GCGGCAGACGGCGCGCGCGGCGAAAGCAATGTGGAGTACGATGCTTGACGCAAAACGGCTACACGGCGAATGAAAAAGCCCG
CGTTAAATCGTTACGCCTGAGTCTTGTCCGTACACGGTATGTACAAAGTGTCCGATAAAGCCGACCTGTTCCGCGACG
TAACTTGGACGCGCCACAGCCGCTTCGATAAGGCGGAACTGGTTTTTGAAGAAAGAAAAACCGTCGTCAAAGGCAAATCC
GACCGCACCACCATCACCCCAACTGGCGCAACACCTACAAAGTCCGGCTTCGGCGGTTCTTATCAAATCAGCGAACCGCT
GCAACTGCGCGCCGGCATCGCTTTTGACAAATCGCCCGTCCGCAACGCGGACTACCGCATGAACAGCCTACCCGACGGCA
ACCGCATCTGGTTCTCCGCCGGTATGAAATACCATATCGGTAAAAACACGTCGTCGATGCCGCCTACACCCACATCCAC
ATCAACGACACCGACTACCGCACGGCGAAGGCAAGCGGCAACGATGTGGACAGCAAAGGCGCGTCTTCCGCACGTTTCAA
AAACCACGCCGACATCATCGGTCTGCAATACCTACAAATTCAAATAA

5 **SEC ID Nº: 20**

Secuencia polipeptídica de *Neisseria meningitidis* BASB044 deducida a partir de la secuencia polinucleotídica de la SEC ID Nº: 19

SGYHFGTQSVNAQSTANAAAAEADASTIFYNPAGLTKLDSSQISVNANIVLPSIHYEADSATDFTGLPVQGSKSGKITK
TTVAPHIYGAYKVNDNLTVGLGVYVPFGSATEYEKDSVLRHNINKLGLTSIAVEPVAWKLNDRHSGAGIIAQHTSAEL
RKYADWGIKSKAEILTAKPPKPNGVAEAAKIQADGHADVKGSDWGFYQLAWMWDINDRARVGVNYRSKVSHTLKGDAEW
AADGAAAKAMWSTMLAANGYTANEKARVKIVTPESLSVHGMVKVSDKADLFGDVTWTRHSRFDKAELVFEKEKTVVKGKS
DRTTITPNWRNTYKVGFGGSYQISEPLQLRAGIAFDKSPVRNADYRMNSLPDGNRIWFSAGMKYHIGKNHVDAAYTHIH
INDTSYRTAKASGNDVDSKGASSARFKNHADIIGLQYTYKFK

SEC ID Nº: 21

TGA GTG GAA AAT GCC GTC TGA AGT

SEC ID Nº: 22

TGC ACC CCG TCA TTC CTG TCT

SEC ID Nº: 23

10

CAT AGC ACC ATG GCC GGC TAC CAC TTC G

SEC ID Nº: 24

CTA GTC TAG ATT ATT TGA ATT TGT AGG TGT AT

SEC ID Nº: 25

- 5 Secuencia polinucleotídica de *Neisseria meningitidis* BASB048 de la cepa ATCC 13090

ATGACATTGCTCAATCTAATGATAATGCAAGATTACGGTATTTCCGTTTGCCTGACACTG
ACGCCCTATTTGCAACATGAACTATTTTCGGCTATGAAATCCTATTTTCCAAATATATC
CTACCCGTTTCACTTTTTACCTTGCCACTATCCCTTTCCCATCCGTTTCGGCTTTTACG
CTGCCTGAAGCATGGCGGGCGGCGCAGCAACATTTCGGCTGATTTTCAAGCGTCCCATAC
CAGCGTGATGCAGTGCGCGCACGGCAACAACAAGCCAAGGCCGATTCCTTCCCATGTA
TCCGCCAATGCCAGCTACCAGCGCCAGCCGCCATCGATTTCTTCCACCCGCGAAACACAG
GGATGGAGCGTGACGGTGGGACAAACCTTATTTGACGCTGCCAAATTTGCACAATACCGC
CAAAGCAGGTTGATACGCAGGCTGCAGAACAGCGTTTCGATGCGGCACGCGAAGAATTG

CTGTTGAAAGTTGCCGAAAGTTATTTCAACGTTTACTCAGCCGAGACACCGTTGCCGCC
CATGCGGCGGAAAAAGAGGCTTATGCCCAGCAGGTAAGGCAGGCGCAGGCTTTATTCAAT
AAAGGTGCTGCCACCGCGCTGGATATTACGAAGCCAAAGCCGGTTACGACAATGCCCTG
GCCCCAAGAAATCGCCGTATTGGCTGAGAAACAAACCTATGAAAACCGATTGAACGACTAC
ACCGGCCCTGGACAGCAAACAAATCGAGGCCATAGATACCGCCAACCTGTTGGCACGCTAT
CTGCCCCAAGCTGGAACGTTACAGTCTGGATGAATGGCAGCGCATTCCTTATCCAACAAT
CATGAATACCGGATGCAGCAGCTTGCCCTGCAAAGCAGCGGACAGGCGCTTCGGGCAGCA
CAGAACAGCCGCTATCCCACCGTTTCTGCCCATGTCGGCTATCAGAATAACCTCTACACT
TCATCTGCGCAGAATAATGACTACCACTATCGGGGCAAAGGGATGAGCGTCGGCGTACAG
TTGAATTTGCCGCTTTATACCGGCGGAGAATTGTCGGGCAAAATCCATGAAGCCGAAGCG
CAATACGGGGCTGCCGAAGCACAGCTGACCGCAACCGAGCGGCACATCAAACCTCGCCGTA
CGCCAGGCTTATACCGAAAGCGGTGCGGCGCGTTACCAAATCATGGCGCAAGAACGGGTT
TTGGAAAGCAGCCGTTTGAAACTGAAATCGACCGAAACCGGCCAACAATACGGCATCCGC
AACCGGCTGGAAGTAATACGGGCGCGGCAGGAAGTCGCCCAAGCAGAACAGAACTGGCT
CAAGCACGGTATAAATTCATGCTGGCTTATTTGCGCTTGGTGAAAGAGAGCGGGTTAGGG
TTGGAAACGGTATTTGCGGAATAA

SEC ID Nº: 26

Secuencia polipeptídica de *Neisseria meningitidis* BASB048 deducida a partir de la secuencia polinucleotídica de la SEC ID Nº: 25

MTLLNLMIMQDYGISVCLTLTPYLQHELFSAKSYFSKYILPVSFLTLPLSLSPSVSAFT
 LPEAWRAAQHSAADFQASHYQRDAVRARQQQAKAAFLPHVSANASYQRQPPSISSTRETQ
 GWSVQVGQTLFDAAKFAQYRQSRFDTQAAEQRFDAAREELLLKVAESYFNVLLSRDTVAA
 HAAEKEAYAQQVRQAQALFNKGAATALDIHEAKAGYDNALAQEI AVLAEKQTYENQLNDY
 TGLDSKQIEAIDTANLLARYLPKLERYSLEWQRIALSNNHEYRMQQLALQSSGQALRAA
 QNSRYPTVSAHVGYNLYTSSAQNNNDYHYRGKGMSSVGVQLNPLTYTGELSGKIHAEAA
 QYGAAEAQLTATERHIKLAVRQAYTESGAARYQIMAQERVLESSRLKPKSTETGQYQYR
 NRLEVIRARQEAQAEQKLAQARYKFMLAYLRLVKESGLGLETVFAE

Materiales depositados

- 5 Se ha depositado un depósito que contiene una cepa de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B en la American Type Culture Collection (denominada en lo sucesivo "ATCC") el 22 de junio de 1997 y se le ha asignado el número de depósito 13090. El depósito se describió como *Neisseria meningitidis* (Albrecht y Ghon) y es una genoteca liofilizada insertada de 1,5-2,9 kb construida a partir de cepas clínicas de *N. meningitidis*. El depósito se describe en Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 8: 1-15 (1958).
- La cepa depositada de *Neisseria meningitidis* se denomina en lo sucesivo "la cepa depositada" o "el ADN de la cepa depositada".
- 10 La cepa depositada contiene los genes completos BASB041, 43, 44, 48. La secuencia de los polinucleótidos contenidos en la cepa depositada, así como la secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido codificado por la misma, son de control en el caso de cualquier conflicto con cualquier descripción de las secuencias de este documento.
- 15 El depósito de la cepa depositada se ha realizado bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el Propósito del Procedimiento de Patentes. La cepa será irrevocablemente y sin restricción o condición dispuesta al público tras la emisión de la patente. La cepa depositada se proporciona meramente por conveniencia de los expertos en la materia, y no es una admisión de que se requiera un depósito para su habilitación, tal como el requerido bajo 35 U.S.C. §112.

LISTA DE SECUENCIAS

- 20 <110> SmithKline Beecham Biologicals S. A.
 <120> Nuevos compuestos
 <130> BM45340
 <160> 26
 <170> FastSEQ para Windows Version 3.0 40
- 25 <210> 1
 <211> 671
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 1

atgaaaaccg	tttccaccgc	cggttgctct	gccgcgctg	ccgtttcact	gaccggctgt	60
gcgaccgaat	cctcacgcag	tctcgaggta	gagaaagtcg	cctcctacaa	tacgcaatac	120
cacggcgctg	gtaccccgat	ttccgctcga	acattcgaca	accgctccag	cttccaaaaa	180
ggcattttct	ccgacgggga	agaccgtttg	ggcagccagg	caaaaaccat	tctggtaacg	240
cacctgcaac	agaccaaccg	cttcaacgta	ctgaaccgca	ccaatttgaa	cgcattaaaa	300
caggaatccg	gcatttccgg	caaagcgcat	aacctgaaag	gcgagatta	tgctgttact	360
ggcgatgtaa	ccgaattcgg	acgcagagat	gtcggcgatc	atcagctctt	cggcattttg	420
ggctcgcgga	aatcgcaaat	cgcctatgca	aaagtggctc	tgaatatcgt	caacgtcaat	480
acttccgaaa	tcgtctattc	cgcacagggc	gcgggcgaat	acgcactttc	caaccgtgaa	540
atcatcggtt	tcggcggcac	ttccggctac	gatgcgactt	tgaacggcaa	agtttttagac	600
ttggcaatcc	gcgaaccgtc	aacagcctgg	ttcaggctgt	tgacaacggc	gcatggcaac	660
ccaaccgtta	a					671

<210> 2
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 2

5

```

Met Lys Thr Val Ser Thr Ala Val Val Leu Ala Ala Ala Ala Val Ser
1           5           10           15
Leu Thr Gly Cys Ala Thr Glu Ser Ser Arg Ser Leu Glu Val Glu Lys
20           25           30
Val Ala Ser Tyr Asn Thr Gln Tyr His Gly Val Arg Thr Pro Ile Ser
35           40           45
Val Gly Thr Phe Asp Asn Arg Ser Ser Phe Gln Lys Gly Ile Phe Ser
50           55           60
Asp Gly Glu Asp Arg Leu Gly Ser Gln Ala Lys Thr Ile Leu Val Thr
65           70           75           80
His Leu Gln Gln Thr Asn Arg Phe Asn Val Leu Asn Arg Thr Asn Leu
85           90           95
Asn Ala Leu Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ser Gly Lys Ala His Asn Leu
100          105          110
Lys Gly Ala Asp Tyr Val Val Thr Gly Asp Val Thr Glu Phe Gly Arg
115          120          125
Arg Asp Val Gly Asp His Gln Leu Phe Gly Ile Leu Gly Arg Gly Lys
130          135          140
Ser Gln Ile Ala Tyr Ala Lys Val Ala Leu Asn Ile Val Asn Val Asn
145          150          155          160
Thr Ser Glu Ile Val Tyr Ser Ala Gln Gly Ala Gly Glu Tyr Ala Leu
165          170          175
Ser Asn Arg Glu Ile Ile Gly Phe Gly Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Ala
180          185          190
Thr Leu Asn Gly Lys Val Leu Asp Leu Ala Ile Arg Glu Pro Ser Thr
195          200          205
Ala Trp Phe Arg Leu Leu Thr Thr Ala His Gly Asn Pro Thr Val
210          215          220
    
```

<210> 3
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 3

10

ES 2 374 055 T3

```

atgaaaaccg tttccaccgc cgttgtcctt gccgccgctg ccgtttcact gaccggctgt      60
gcgaccgaat cctcacgcag tctcgaggta gagaaagtcg cctcctacaa tacgcaatac      120
cacggcggtgc gtaccccgat ttccgtcgga acattcgaca accgctccag cttccaaaaa      180
ggcattttct ccgacgggga agaccggttg gccagccagg caaaaacccat tctggtaacg      240
cacctgcaac agaccaaccg cttcaacgta ctgaaccgca ccaatttgaa cgcattaaaa      300
caggaatccg gcatttccgg caaagcgcat aacctgaaag gcgcagatta tgtcgttact      360
ggcgatgtaa ccgaattcgg acgcagagat gtcggcgatc atcagctctt cggcattttg      420
ggtcgcgga aatcgcaa atcgctatgca aaagtggctc tgaatatcgt caacgtcaat      480
acttccgaaa tcgtctattc cgcacagggc gccggcggaat acgcactttc caaccgtgaa      540
atcatcggtt tcggcggcac ttccggctac gatgcgactt tgaacggcaa agtttttagac      600
ttggcaatcc gcgaagccgt caacagcctg gttcaggctg ttgacaacgg cgcattggcaa      660
cccaaccggt aa                                                                672

```

- <210> 4
- 5 <211> 223
- <212> PRT
- <213> *Neisseria meningitidis*
- <400> 4

Met Lys Thr Val Ser Thr Ala Val Val Leu Ala Ala Ala Ala Val Ser
1 5 10 15
Leu Thr Gly Cys Ala Thr Glu Ser Ser Arg Ser Leu Glu Val Glu Lys
20 25 30
Val Ala Ser Tyr Asn Thr Gln Tyr His Gly Val Arg Thr Pro Ile Ser
35 40 45
Val Gly Thr Phe Asp Asn Arg Ser Ser Phe Gln Lys Gly Ile Phe Ser
50 55 60
Asp Gly Glu Asp Arg Leu Gly Ser Gln Ala Lys Thr Ile Leu Val Thr
65 70 75 80
His Leu Gln Gln Thr Asn Arg Phe Asn Val Leu Asn Arg Thr Asn Leu
85 90 95
Asn Ala Leu Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ser Gly Lys Ala His Asn Leu
100 105 110
Lys Gly Ala Asp Tyr Val Val Thr Gly Asp Val Thr Glu Phe Gly Arg
115 120 125
Arg Asp Val Gly Asp His Gln Leu Phe Gly Ile Leu Gly Arg Gly Lys
130 135 140
Ser Gln Ile Ala Tyr Ala Lys Val Ala Leu Asn Ile Val Asn Val Asn
145 150 155 160
Thr Ser Glu Ile Val Tyr Ser Ala Gln Gly Ala Gly Glu Tyr Ala Leu
165 170 175
Ser Asn Arg Glu Ile Ile Gly Phe Gly Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Ala
180 185 190
Thr Leu Asn Gly Lys Val Leu Asp Leu Ala Ile Arg Glu Ala Val Asn
195 200 205

Ser Leu Val Gln Ala Val Asp Asn Gly Ala Trp Gln Pro Asn Arg
210 215 220

<210> 5
<211> 672
5 <212> ADN
<213> *Neisseria meningitidis*
<400> 5

ES 2 374 055 T3

```

atgaaaaccg tttccaccgc cgttgtcctt gccgccgctg ccgtttcact gaccggctgt      60
gcgaccgaat cctcacgcag tctcgaggta gagaaagtcg cctcctacaa tacgcaatat      120
cacgggtgttc gtaccccgat ttccgtcgga acattcgaca accgctccag cttccaaaaa      180
ggcatttttct ccgacgggga agaccgtttg gccagccagg caaaaaccat tctagtaacg      240
cacctgcaac agaccaaccg cttcaacgta ctgaaccgca ccaatttgaa cgcattaaaa      300
caggaatccg gcatttcggg caaagcgcat aacctgaaag gcgcagatta tgtcgttacc      360
ggcgatgtaa ccgaattcgg acgcagagat gtcggcgatc atcagctctt cggcattttg      420
ggtcgcgcca aatcgcaaat cgcctatgca aaagtggctc tgaatatcgt caacgtcaat      480
acttccgaaa tcgtctattc cgcacagggc gcgggcgaat acgcactttc caaccgtgaa      540
atcatcggtt tcggcgggac ttccggctac gatgcgactt tgaacggcaa agtttttagac      600
ttggcaatcc gcgaagccgt caacagcctg gttcaggctg ttgacaacgg cgcattggcaa      660
cccaaccgtt aa                                                    672

```

<210> 6

<211> 223

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 6

5

```

Met Lys Thr Val Ser Thr Ala Val Val Leu Ala Ala Ala Ala Val Ser
 1              5              10              15
Leu Thr Gly Cys Ala Thr Glu Ser Ser Arg Ser Leu Glu Val Glu Lys
      20              25              30
Val Ala Ser Tyr Asn Thr Gln Tyr His Gly Val Arg Thr Pro Ile Ser
      35              40              45
Val Gly Thr Phe Asp Asn Arg Ser Ser Phe Gln Lys Gly Ile Phe Ser
      50              55              60
Asp Gly Glu Asp Arg Leu Gly Ser Gln Ala Lys Thr Ile Leu Val Thr
65              70              75              80
His Leu Gln Gln Thr Asn Arg Phe Asn Val Leu Asn Arg Thr Asn Leu

```

ES 2 374 055 T3

	85	90	95
Asn	Ala	Leu	Lys
Gln	Glu	Ser	Gly
Ile	Ser	Gly	Lys
Ala	His	Asn	Leu
100	105	110	
Lys	Gly	Ala	Asp
Tyr	Val	Val	Thr
Gly	Asp	Val	Thr
Glu	Phe	Gly	Arg
115	120	125	
Arg	Asp	Val	Gly
Asp	His	Gln	Leu
Phe	Gly	Ile	Leu
Gly	Arg	Gly	Lys
130	135	140	
Ser	Gln	Ile	Ala
Tyr	Ala	Lys	Val
Ala	Leu	Asn	Ile
Val	Asn	Val	Asn
145	150	155	160
Thr	Ser	Glu	Ile
Val	Tyr	Ser	Ala
Gln	Gly	Ala	Gly
Glu	Tyr	Ala	Leu
165	170	175	
Ser	Asn	Arg	Glu
Ile	Ile	Gly	Phe
Gly	Phe	Gly	Gly
Thr	Ser	Gly	Tyr
Asp	Ala		
180	185	190	
Thr	Leu	Asn	Gly
Lys	Val	Leu	Asp
Leu	Ala	Ile	Arg
Glu	Ala	Val	Asn
195	200	205	
Ser	Leu	Val	Gln
Ala	Val	Asp	Asn
Gly	Ala	Trp	Gln
Pro	Asn	Arg	
210	215	220	

	<210> 7	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 7	
10	aatgaaaacc gttccaccg c	21
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 8	
	tcatttctcc ttaacggt	18
	<210> 9	
20	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 9	
	aggcagagggc atatgaaaac cggttccacc gccgtgtgcc ttgc	44
	<210> 10	
	<211> 45	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 10	
	aggcagagggc tcgactttct ccttaacggt tgggttgcca tgcgc	45

<210> 11
 <211> 489
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 11

5

```

atgaaaaaat accttatccc tctttccatt gcggcagttc tttccggctg ccagtctatt      60
tatgtgcccc cattgacgga aatccccgtg aatcctatca ataccgtaa aacggaagca      120
cctgcaaaaag gtttccgcct tgcctcttcg cattggacgg atgttgccaa aatcagcgat      180
gaagcgacgc gcttgggcta tcaggtgggt atcggtaaaa tgaccaaggt tcaggcggcg      240
caatatctga acaacttcag aaaacgcctg gtcggacgca atgccgtcga tgacagtatg      300
tatgaaatct acctgcgttc ggcgatagac agccagcggg gcgcaatcaa tacggaacag      360
tccaagctgt atatccagaa tgccttgccg ggctggcagc agcgttgga aaatatggat      420
gtcaaaccce acaaccccg c atttaccac tttttgatgg aagtgatgaa gatgcagccc      480
ttgaaatga                                     489
    
```

<210> 12
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 12

10

```

Met Lys Lys Tyr Leu Ile Pro Leu Ser Ile Ala Ala Val Leu Ser Gly
 1           5           10          15
Cys Gln Ser Ile Tyr Val Pro Thr Leu Thr Glu Ile Pro Val Asn Pro
          20          25          30
Ile Asn Thr Val Lys Thr Glu Ala Pro Ala Lys Gly Phe Arg Leu Ala
          35          40          45
Ser Ser His Trp Thr Asp Val Ala Lys Ile Ser Asp Glu Ala Thr Arg
          50          55          60
Leu Gly Tyr Gln Val Gly Ile Gly Lys Met Thr Lys Val Gln Ala Ala
65          70          75          80
Gln Tyr Leu Asn Asn Phe Arg Lys Arg Leu Val Gly Arg Asn Ala Val
          85          90          95
Asp Asp Ser Met Tyr Glu Ile Tyr Leu Arg Ser Ala Ile Asp Ser Gln
          100         105         110
Arg Gly Ala Ile Asn Thr Glu Gln Ser Lys Leu Tyr Ile Gln Asn Ala
          115         120         125
Leu Arg Gly Trp Gln Gln Arg Trp Lys Asn Met Asp Val Lys Pro Asn
          130         135         140
Asn Pro Ala Phe Thr Asn Phe Leu Met Glu Val Met Lys Met Gln Pro
145          150          155          160
Leu Lys
    
```

15

5 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 atgaaaaaat accttatccc tctttcc 27

10 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 14
 tcatttcaag ggctgcat 18

15 <210> 15
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 aggagagggc atatgaaaaa ataccttata cctctttcca ttgcc 45

20 <210> 16
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 aggagagggc tcgagtttca agggctgcat cttcatcact tc 42

25 <210> 17
 <211> 1401
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 17

ES 2 374 055 T3

```

atgacccctt cgcactgaa aaaaaccgtc ctgctgctcg gcaactgcctt tgccgcgcga      60
tccgcacaag cctccggcta ccacttcggc acacagtcgg tcaacgcgca aagcacggca      120
aatgccgccc cgcagaagc cgccgacgca tcgaccatct tctacaaccc tgccggcctg      180
accaaactcg acagcagcca gatttcctgc aacgccaaaca tcgtgctgcc cagcattcat      240
tatgaggcgg attccgccac cgactttacc gggcttcccg tccaagggtc gaaaagcggc      300
aaaatcacca aaaccacggt cgcgccccac atctacggcg catacaaagt caacgacaat      360
ctgaccgtag gcttggggcg gtacgtcccc ttcgggttctg ccaccgaata cgaaaaagat      420
tccgtgttgc gccacaacat caacaaactc ggtctgacca gcatcgccgt cgaacctgtc      480
gccgcgtgga aactcaacga ccgccattcc ttcggcgagc gcatcatcgc ccaacatact      540
tccgcogaac tgcgcaaata tgccgactgg gggattaaga gtaaagcaga gatattgacg      600
gaaaaaccgc ccaaacctaa cgggtgtagcc gaagctgcaa aaattcaggc cgacggacac      660
gccgatgtca aaggcagcga ttggggcttc ggctaccaac tggcggtgat gtgggacatc      720
aacgaccgtg cgcgcgtggg cgtgaactac cgttcctaaag tctcgcacac gctcaaaggc      780
gatgccgaat gggcggcaga cggcgcggcg gcgaaagcaa tgtggagtac gatgcttgca      840
gcaaaccggc acacggcgaa tgaaaaagcc cgcgttaaaa tcgttacgcc tgagtctttg      900
tccgtacacg gtatgtacaa agtgtccgat aaagccgacc tgttcggcga cgtaacttgg      960
acgcgccaca gccgcttcga taaggcggaa ctgggtttttg aaaaagaaaa aaccgtcgtc     1020
aaaggcaaat ccgaccgcac caccatcacc cccaactggc gcaacaccta caaagtcggc     1080
ttcggcggtt cttatcaaat cagcgaaccg ctgcaactgc gcgccggcat cgcttttgac     1140
aaatcgcccc tccgcaacgc cgactaccgc atgaacagcc tgcccgacgg caaccgcac     1200
tggttctccg ccggtatgaa ataccatata ggtaaaaacc acgtcgtcga tgccgcctac     1260
accacatcc acatcaacga caccactac cgcacggcga aggcaagcgg caacgatgtg     1320
gacagcaaag gcgcgtcttc cgcacgtttc aaaaaccacg ccgacatcat cggcctgcaa     1380
tacacctaca aattcaaata a                                     1401

```

<210> 18
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 18

```

Met Thr Pro Ser Ala Leu Lys Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly Thr Ala
  1              5              10              15
Phe Ala Ala Ala Ser Ala Gln Ala Ser Gly Tyr His Phe Gly Thr Gln
      20              25              30
Ser Val Asn Ala Gln Ser Thr Ala Asn Ala Ala Ala Ala Glu Ala Ala
      35              40              45

```

Asp Ala Ser Thr Ile Phe Tyr Asn Pro Ala Gly Leu Thr Lys Leu Asp
 50 55 60
 Ser Ser Gln Ile Ser Val Asn Ala Asn Ile Val Leu Pro Ser Ile His
 65 70 75 80
 Tyr Glu Ala Asp Ser Ala Thr Asp Phe Thr Gly Leu Pro Val Gln Gly
 85 90 95
 Ser Lys Ser Gly Lys Ile Thr Lys Thr Thr Val Ala Pro His Ile Tyr
 100 105 110
 Gly Ala Tyr Lys Val Asn Asp Asn Leu Thr Val Gly Leu Gly Val Tyr
 115 120 125
 Val Pro Phe Gly Ser Ala Thr Glu Tyr Glu Lys Asp Ser Val Leu Arg
 130 135 140
 His Asn Ile Asn Lys Leu Gly Leu Thr Ser Ile Ala Val Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Ala Ala Trp Lys Leu Asn Asp Arg His Ser Phe Gly Ala Gly Ile Ile
 165 170 175
 Ala Gln His Thr Ser Ala Glu Leu Arg Lys Tyr Ala Asp Trp Gly Ile
 180 185 190
 Lys Ser Lys Ala Glu Ile Leu Thr Ala Lys Pro Pro Lys Pro Asn Gly
 195 200 205
 Val Ala Glu Ala Ala Lys Ile Gln Ala Asp Gly His Ala Asp Val Lys
 210 215 220
 Gly Ser Asp Trp Gly Phe Gly Tyr Gln Leu Ala Trp Met Trp Asp Ile
 225 230 235 240
 Asn Asp Arg Ala Arg Val Gly Val Asn Tyr Arg Ser Lys Val Ser His
 245 250 255
 Thr Leu Lys Gly Asp Ala Glu Trp Ala Ala Asp Gly Ala Ala Ala Lys
 260 265 270
 Ala Met Trp Ser Thr Met Leu Ala Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Asn Glu
 275 280 285
 Lys Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Pro Glu Ser Leu Ser Val His Gly
 290 295 300
 Met Tyr Lys Val Ser Asp Lys Ala Asp Leu Phe Gly Asp Val Thr Trp
 305 310 315 320
 Thr Arg His Ser Arg Phe Asp Lys Ala Glu Leu Val Phe Glu Lys Glu
 325 330 335
 Lys Thr Val Val Lys Gly Lys Ser Asp Arg Thr Thr Ile Thr Pro Asn
 340 345 350
 Trp Arg Asn Thr Tyr Lys Val Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gln Ile Ser

355	360	365
Glu Pro Leu Gln Leu Arg Ala Gly Ile Ala Phe Asp Lys Ser Pro Val		
370	375	380
Arg Asn Ala Asp Tyr Arg Met Asn Ser Leu Pro Asp Gly Asn Arg Ile		
385	390	395
Trp Phe Ser Ala Gly Met Lys Tyr His Ile Gly Lys Asn His Val Val		
405	410	415
Asp Ala Ala Tyr Thr His Ile His Ile Asn Asp Thr Thr Tyr Arg Thr		
420	425	430
Ala Lys Ala Ser Gly Asn Asp Val Asp Ser Lys Gly Ala Ser Ser Ala		
435	440	445
Arg Phe Lys Asn His Ala Asp Ile Ile Gly Leu Gln Tyr Thr Tyr Lys		
450	455	460
Phe Lys		
465		

<210> 19
 <211> 1329
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 19

tccggctacc acttcggcac acagtcggtc aacgcgcaaa gcacggcaaa tgccgccgcc	60
gcagaagccg cgcacgcac gaccatcttc tacaaccctg ccggcctgac caaactcgac	120
agcagccaga tttccgtcaa cgccaacatc gtgctgcccc gcattcatta tgaggcggat	180
tccgccaccg actttaccgg gcttcccgtc caagggttcga aaagcggcaa aatcaccaaa	240
accacggtcg cgccccacat ctacggcgca taaaaagtca acgacaatct gaccgtgggc	300
ttgggcgtgt acgtcccctt cggctctgcc accgaatacg aaaaagattc cgtgttgccg	360
cacaacatca aaaaactcgg tctgaccagc atcgccgtcg aacctgtcgc cgcgaggaaa	420
ctcaacgacc gccattcctt cggcgagggc atcatcgccc aacatacttc cgccgaactg	480
cgcaaatacg ccgactgggg gattaagagt aaagcagaga tattgacggc aaaaccgccc	540
aaacctaacy gtgtagccga agctgcaaaa attcaggccg acggacacgc cgatgtcaaa	600
ggcagcgatt ggggcttcgg ctaccaactg gcgtggatgt gggacatcaa cgaccgtgcg	660
cgcgtgggcg tgaactaccg ttccaaagtc tcgcacacgc tcaaaggcga tgccgaatgg	720
gcggcagacg gcgcggcggc gaaagcaatg tggagtacga tgcttgacgc aaacggctac	780
acggcgcaatg aaaaagcccg cgtaaãatc gttãgcctg agtctttgtc cgtacacggt	840
atgtacaaag tgtccgataa agccgacctg ttcggcgacg taacttggac gcgccacagc	900
cgtttcgata aggcggaact ggtttttgaa aaagaaaaaa ccgtcgtcaa aggcaaatcc	960
gaccgcacca ccataccccc caactggcgc aacacctaca aagtcggctt cggcggttct	1020

```
tatcaaata gcaaacgct gcaactgcgc gccggcatcg cttttgacaa atcgcccgtc 1080
cgcaacgccg actaccgcat gaacagccta cccgacggca accgcatctg gttctccgcc 1140
ggtatgaaat accatatcgg taaaaaacac gtcgtcgatg ccgcctacac ccacatccac 1200
atcaacgaca ccagctaccg cacggcgaag gcaagcggca acgatgtgga cagcaaaggc 1260
gcgtcttccg cacgtttcaa aaaccacgcc gacatcatcg gtctgcaata cacctacaaa 1320
ttcaaataa 1329
```

5 <210> 20
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 20

```
Ser Gly Tyr His Phe Gly Thr Gln Ser Val Asn Ala Gln Ser Thr Ala
1          5          10          15
Asn Ala Ala Ala Ala Glu Ala Ala Asp Ala Ser Thr Ile Phe Tyr Asn
20          25          30
Pro Ala Gly Leu Thr Lys Leu Asp Ser Ser Gln Ile Ser Val Asn Ala
35          40          45
Asn Ile Val Leu Pro Ser Ile His Tyr Glu Ala Asp Ser Ala Thr Asp
50          55          60
Phe Thr Gly Leu Pro Val Gln Gly Ser Lys Ser Gly Lys Ile Thr Lys
65          70          75          80
Thr Thr Val Ala Pro His Ile Tyr Gly Ala Tyr Lys Val Asn Asp Asn
85          90          95
Leu Thr Val Gly Leu Gly Val Tyr Val Pro Phe Gly Ser Ala Thr Glu
100         105         110
Tyr Glu Lys Asp Ser Val Leu Arg His Asn Ile Asn Lys Leu Gly Leu
115         120         125
Thr Ser Ile Ala Val Glu Pro Val Ala Ala Trp Lys Leu Asn Asp Arg
130         135         140
His Ser Phe Gly Ala Gly Ile Ile Ala Gln His Thr Ser Ala Glu Leu
145         150         155         160
Arg Lys Tyr Ala Asp Trp Gly Ile Lys Ser Lys Ala Glu Ile Leu Thr
165         170         175
Ala Lys Pro Pro Lys Pro Asn Gly Val Ala Glu Ala Ala Lys Ile Gln
180         185         190
Ala Asp Gly His Ala Asp Val Lys Gly Ser Asp Trp Gly Phe Gly Tyr
195         200         205
```

Gln Leu Ala Trp Met Trp Asp Ile Asn Asp Arg Ala Arg Val Gly Val
 210 215 220
 Asn Tyr Arg Ser Lys Val Ser His Thr Leu Lys Gly Asp Ala Glu Trp
 225 230 235 240
 Ala Ala Asp Gly Ala Ala Ala Lys Ala Met Trp Ser Thr Met Leu Ala
 245 250 255
 Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Asn Glu Lys Ala Arg Val Lys Ile Val Thr
 260 265 270
 Pro Glu Ser Leu Ser Val His Gly Met Tyr Lys Val Ser Asp Lys Ala
 275 280 285
 Asp Leu Phe Gly Asp Val Thr Trp Thr Arg His Ser Arg Phe Asp Lys
 290 295 300
 Ala Glu Leu Val Phe Glu Lys Glu Lys Thr Val Val Lys Gly Lys Ser
 305 310 315 320
 Asp Arg Thr Thr Ile Thr Pro Asn Trp Arg Asn Thr Tyr Lys Val Gly
 325 330 335
 Phe Gly Gly Ser Tyr Gln Ile Ser Glu Pro Leu Gln Leu Arg Ala Gly
 340 345 350
 Ile Ala Phe Asp Lys Ser Pro Val Arg Asn Ala Asp Tyr Arg Met Asn
 355 360 365
 Ser Leu Pro Asp Gly Asn Arg Ile Trp Phe Ser Ala Gly Met Lys Tyr
 370 375 380
 His Ile Gly Lys Asn His Val Val Asp Ala Ala Tyr Thr His Ile His
 385 390 395 400
 Ile Asn Asp Thr Ser Tyr Arg Thr Ala Lys Ala Ser Gly Asn Asp Val
 405 410 415
 Asp Ser Lys Gly Ala Ser Ser Ala Arg Phe Lys Asn His Ala Asp Ile
 420 425 430
 Ile Gly Leu Gln Tyr Thr Tyr Lys Phe Lys
 435 440

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 21

tgagtggaaa atgccgtctg aagt 24

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 22

	tgacccccgt cattctctgc t	21	
	<210> 23		
	<211> 28		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 23		
	catagcacca tggccggcta ccacttcg	28	
10	<210> 24		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> Cebador		
	<400> 24		
	ctagtctaga ttatttgaat ttgtaggtgt at	32	
	<210> 25		
	<211> 1404		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Neisseria meningitidis</i>		
	<400> 25		
	atgacattgc tcaatctaata gataatgcaa gattacggta tttccgtttg cctgacactg	60	
	acgccctatt tgcaacatga actatttttcg gctatgaaat cctattttttc caaatatatac	120	
	ctaccgcgttt cacttttttac cttgccaacta tccctttccc catccgtttc ggctttttacg	180	
	ctgcctgaag catggcgggc ggcgcagcaa cattcggctg attttcaagc gtcccattac	240	
	cagcgtgatg cagtgcgcgc acggcaacaa caagccaagg ccgcattcct tccccatgta	300	
	tccgccaatg ccagctacca gcgccagccg ccatcgattt cttccaccgc cgaaacacag	360	
	ggatggagcg tgcaggtggg acaaacctta tttgacgctg ccaaattttgc acaataaccgc	420	
	caaagcaggt tcgatacgca ggctgcagaa cagcgtttcg atgcggcacg cgaagaattg	480	
	ctgttgaaaag ttgccgaaaag ttattttcaac gttttactca gccgagacac cgttgccgcc	540	
	catgcccgcg aaaaagaggc ttatgccagc caggttaaggc aggcgcaggc tttattcaat	600	
	aaaggtgctg ccaccgcgct ggatattcac gaagccaaag ccggttacga caatgccttg	660	
	gcccaagaaa tcgccgtatt ggctgagaaa caaacctatg aaaaccagtt gaacgactac	720	
	accggccttg acagcaaaca aatcgaggcc atagataccg ccaacctgtt ggcacgctat	780	
	ctgcccagc tggaacgtta cagtctggat gaatggcagc gcattgcctt atccaacaat	840	
	catgaatacc ggatgcagca gcttgccctg caaagcagcg gacaggcgct tcgggcagca	900	
	cagaacagcc gctatcccac cgtttctgccc catgtcggct atcagaataa cctctacact	960	
	tcatctgcgc agaataatga ctaccactat cggggcaaag ggatgagcgt cggcgtacag	1020	
	ttgaattttgc cgcttttatac cggcggagaa ttgtcgggca aaatccatga agccgaagcg	1080	
	caatacgggg ctgccgaagc acagctgacc gcaaccgagc ggcacatcaa actcgcctga	1140	
	cgcagggctt ataccgaaaag cggcgcggcg cgttaccaaa tcatggcgca agaacggggt	1200	
	ttggaaaagca gccgtttgaa actgaaatcg accgaaaccg gccacaataa cggcatccgc	1260	
	aaccggcttg aagtaatacg ggcgcggcag gaagtgcgcc aagcagaaca gaaactggct	1320	
	caagcacggt ataaattcat gctggcttat ttgcgcttg tgaagagag cgggttaggg	1380	
	ttggaaacgg tatttgcgga ataa	1404	

<210> 26
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 26

5

```

Met Thr Leu Leu Asn Leu Met Ile Met Gln Asp Tyr Gly Ile Ser Val
 1           5           10           15
Cys Leu Thr Leu Thr Pro Tyr Leu Gln His Glu Leu Phe Ser Ala Met
      20           25           30
Lys Ser Tyr Phe Ser Lys Tyr Ile Leu Pro Val Ser Leu Phe Thr Leu
    
```

ES 2 374 055 T3

35	40	45
Pro Leu Ser Leu Ser Pro Ser Val Ser Ala Phe Thr Leu Pro Glu Ala		
50	55	60
Trp Arg Ala Ala Gln Gln His Ser Ala Asp Phe Gln Ala Ser His Tyr		
65	70	75
Gln Arg Asp Ala Val Arg Ala Arg Gln Gln Gln Ala Lys Ala Ala Phe		
85	90	95
Leu Pro His Val Ser Ala Asn Ala Ser Tyr Gln Arg Gln Pro Pro Ser		
100	105	110
Ile Ser Ser Thr Arg Glu Thr Gln Gly Trp Ser Val Gln Val Gly Gln		
115	120	125
Thr Leu Phe Asp Ala Ala Lys Phe Ala Gln Tyr Arg Gln Ser Arg Phe		
130	135	140
Asp Thr Gln Ala Ala Glu Gln Arg Phe Asp Ala Ala Arg Glu Glu Leu		
145	150	155
Leu Leu Lys Val Ala Glu Ser Tyr Phe Asn Val Leu Leu Ser Arg Asp		
165	170	175
Thr Val Ala Ala His Ala Ala Glu Lys Glu Ala Tyr Ala Gln Gln Val		
180	185	190
Arg Gln Ala Gln Ala Leu Phe Asn Lys Gly Ala Ala Thr Ala Leu Asp		
195	200	205
Ile His Glu Ala Lys Ala Gly Tyr Asp Asn Ala Leu Ala Gln Glu Ile		
210	215	220
Ala Val Leu Ala Glu Lys Gln Thr Tyr Glu Asn Gln Leu Asn Asp Tyr		
225	230	235
Thr Gly Leu Asp Ser Lys Gln Ile Glu Ala Ile Asp Thr Ala Asn Leu		
245	250	255
Leu Ala Arg Tyr Leu Pro Lys Leu Glu Arg Tyr Ser Leu Asp Glu Trp		
260	265	270
Gln Arg Ile Ala Leu Ser Asn Asn His Glu Tyr Arg Met Gln Gln Leu		
275	280	285
Ala Leu Gln Ser Ser Gly Gln Ala Leu Arg Ala Ala Gln Asn Ser Arg		
290	295	300
Tyr Pro Thr Val Ser Ala His Val Gly Tyr Gln Asn Asn Leu Tyr Thr		
305	310	315
Ser Ser Ala Gln Asn Asn Asp Tyr His Tyr Arg Gly Lys Gly Met Ser		
325	330	335
Val Gly Val Gln Leu Asn Leu Pro Leu Tyr Thr Gly Gly Glu Leu Ser		
340	345	350

ES 2 374 055 T3

Gly Lys Ile His Glu Ala Glu Ala Gln Tyr Gly Ala Ala Glu Ala Gln
 355 360 365
 Leu Thr Ala Thr Glu Arg His Ile Lys Leu Ala Val Arg Gln Ala Tyr
 370 375 380
 Thr Glu Ser Gly Ala Ala Arg Tyr Gln Ile Met Ala Gln Glu Arg Val
 385 390 395 400
 Leu Glu Ser Ser Arg Leu Lys Leu Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Gln
 405 410 415
 Tyr Gly Ile Arg Asn Arg Leu Glu Val Ile Arg Ala Arg Gln Glu Val
 420 425 430
 Ala Gln Ala Glu Gln Lys Leu Ala Gln Ala Arg Tyr Lys Phe Met Leu
 435 440 445
 Ala Tyr Leu Arg Leu Val Lys Glu Ser Gly Leu Gly Leu Glu Thr Val
 450 455 460
 Phe Ala Glu
 465

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 97% con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4 e SEC ID N°: 6.
- 5 2. Un polipéptido aislado según se reivindica en la reivindicación 1 en el que la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4 e SEC ID N°: 6.
3. El polipéptido según se reivindica en la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4 e SEC ID N°: 6.
- 10 4. Un polipéptido aislado de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.
5. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 97% con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 2, 4 ó 6 sobre la longitud completa de las SEC ID N°: 2, 4 ó 6 respectivamente.
- 15 7. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 97% con una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de las SEC ID N°: 2, 4 ó 6 a lo largo de toda la región codificante.
8. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 97% con la de las SEC ID N°: 1, 3 ó 5 sobre la longitud completa de las SEC ID N°: 1, 3 ó 5 respectivamente.
- 20 9. Un polinucleótido aislado según se reivindica en la reivindicación 8 que tiene una identidad de al menos el 99% con la de las SEC ID N°: 1, 3 ó 5 sobre la longitud completa de las SEC ID N°: 1, 3 ó 5 respectivamente.
10. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.
11. Un polinucleótido aislado que comprende el polinucleótido de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5.
- 25 12. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 obtenible mediante el cribado de una genoteca apropiada en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada con la secuencia de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 o un fragmento de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5.
13. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 o un polinucleótido aislado que codifica para la proteína de fusión de la reivindicación 5.
- 30 14. El vector de expresión de la reivindicación 13 que es recombinante.
15. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 13 ó 14.
16. Un microorganismo vivo recombinante que comprende un vector de expresión según la reivindicación 13 ó 14.
17. Un procedimiento para producir un polipéptido una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 15 en unas condiciones suficientes para la producción de dicho polipéptido o proteína de fusión, y recuperar el polipéptido o la proteína de fusión a partir del medio de cultivo.
- 35 18. Un procedimiento para expresar un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, o un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión de la reivindicación 5, que comprende transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que comprende al menos uno de dichos polinucleótidos, y cultivar dicha célula hospedadora en unas condiciones suficientes para la expresión de uno cualquiera de dichos polinucleótidos.
- 40 19. Una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz del polipéptido o de la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 20. Una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz del polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 y un portador farmacéuticamente aceptable.
21. La composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, en la que dicha composición comprende al menos un antígeno cualquiera de *Neisseria meningitidis*.

22. Una composición de vacuna que comprende:

- (i) una cantidad eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o
- 5 un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o
- 10 un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno;
- (ii) un portador farmacéuticamente aceptable; y
- (iii) un coadyuvante seleccionado del grupo que consiste en 3 Des-O-acilado monofosforil lípido A, QS21, QS21 y colesterol.

23. Una composición de vacuna que comprende:

- 15 (i) una cantidad eficaz de un polinucleótido que tiene una identidad de al menos el 85% con la de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5;
- (ii) un portador farmacéuticamente aceptable; y
- (iii) un coadyuvante seleccionado del grupo que consiste en 3 Des-O-acilado monofosforil lípido A, QS21, QS21 y colesterol.

20 24. Una composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23 en la que el portador comprende una emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable.

25. Una composición de vacuna según la reivindicación 24 en la que el aceite metabolizable comprende escualeno, alfa tocoferol y Tween 80.

25 26. Un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de una infección por *Neisseria meningitidis*, que comprende identificar si hay presente un polipéptido según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una muestra biológica procedente de un animal sospechoso de tener dicha infección.

27. Un procedimiento de purificación de (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (ii) un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (iii) un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno, en el que dicho procedimiento se elige del grupo que consiste en precipitación con sulfato amónico, precipitación con etanol, extracción ácida, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacciones hidrófobas, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina.

28. Un procedimiento para producir una composición de vacuna que comprende (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (ii) un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (iii) un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno, en el que el procedimiento comprende el procedimiento de la reivindicación 27 y comprende adicionalmente la etapa de formular dicho polipéptido o fragmento inmunógeno con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

29. Uso de una composición que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de un polipéptido o proteína de fusión según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de un medicamento para prevenir la infección por *Neisseria meningitidis*.

30. Uso de una composición que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de un polinucleótido según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 en la preparación de un medicamento para prevenir la infección por *Neisseria meningitidis*.

31. Uso de (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (ii) un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o (iii) un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno, en la preparación de un medicamento para prevenir la infección por *Neisseria meningitidis*.

32. Uso de un polinucleótido que tiene una identidad de al menos el 85% con la de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, en la preparación de un medicamento para prevenir la infección por *Neisseria meningitidis*.

33. Un polipéptido o fragmento inmunógeno seleccionado del grupo que consiste en

- 5 (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6;
- (ii) un fragmento inmunógeno de un polipéptido con la secuencia de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, en el que el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, y en el que el fragmento es capaz (si es necesario, cuando se acopla a un portador) de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6; y
- 10 (iii) un polipéptido que comprende dicho fragmento inmunógeno,

para su uso en la prevención de la infección por *Neisseria meningitidis*.

15 34. Un polinucleótido que tiene una identidad de al menos el 85% con la de la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, para su uso en la prevención de la infección por *Neisseria meningitidis*.

Figura 1: alineación de las secuencias polinucleotídicas de BASB041

La identidad de la SEC ID Nº: 1 está indicada por un punto, y unas comillas ("-") indican un nucleótido ausente.

	*	20	*	
Secid1	:	ATGAAAACCGTTTCCACCGCCGTTGTCCTT	:	30
Secid3	:	:	30
Secid5	:	:	30
	40	*	60	
Secid1	:	GCCGCCGCTGCCGTTTCACTGACCGGCTGT	:	60
Secid3	:	:	60
Secid5	:	:	60
	*	80	*	
Secid1	:	GCGACCGAATCCTCACGCAGTCTCGAGGTA	:	90
Secid3	:	:	90
Secid5	:	:	90
	100	*	120	
Secid1	:	GAGAAAGTCGCCTCCTACAATACGCAATAC	:	120
Secid3	:	:	120
Secid5	:T	:	120
	*	140	*	
Secid1	:	CACGGCGTGCGTACCCCGATTTCGTCGGA	:	150
Secid3	:	:	150
Secid5	:T..T.....	:	150
	160	*	180	
Secid1	:	ACATTTCGACAACCGCTCCAGCTTCCAAAAA	:	180
Secid3	:	:	180

Fig 1 (continuación)

Secid5 : : 180

* 200 *

Secid1 : GGCATTTTCTCCGACGGGGAAGACCGTTTG : 210

Secid3 : : 210

Secid5 : : 210

220 * 240

Secid1 : GGCAGCCAGGCCAAAAACCATTTCTGGTAACG : 240

Secid3 : : 240

Secid5 :A..... : 240

* 260 *

Secid1 : CACCTGCAACAGACCAACCGCTTCAACGTA : 270

Secid3 : : 270

Secid5 : : 270

280 * 300

Secid1 : CTGAACCGCACCAATTTGAACGCATTAAAA : 300

Secid3 : : 300

Secid5 : : 300

* 320 *

Secid1 : CAGGAATCCGGCATTTCGGCAAAGCGCAT : 330

Secid3 : : 330

Secid5 : : 330

340 * 360

Secid1 : AACCTGAAAGGCGCAGATTATGTCGTTACT : 360

Secid3 : : 360

Secid5 :C : 360

Fig 1 (continuación)

	*	380	*	
Secid1	:	GGCGATGTAACCGAATTCGGACGCAGAGAT	:	390
Secid3	:	:	390
Secid5	:	:	390

	400	*	420	
Secid1	:	GTCGGCGATCATCAGCTCTTCGGCATT	:	420
Secid3	:	:	420
Secid5	:	:	420

	*	440	*	
Secid1	:	GGTCGCGGCAAATCGCAAATCGCCTATGCA	:	450
Secid3	:	:	450
Secid5	:	:	450

	460	*	480	
Secid1	:	AAAGTGGCTCTGAATATCGTCAACGTCAAT	:	480
Secid3	:	:	480
Secid5	:	:	480

	*	500	*	
Secid1	:	ACTTCCGAAATCGTCTATTCCGCACAGGGC	:	510
Secid3	:	:	510
Secid5	:	:	510

	520	*	540	
Secid1	:	GCGGGCGAATACGCACTTTCCAACCGTGAA	:	540
Secid3	:	:	540
Secid5	:	:	540

	*	560	*	
Secid1	:	ATCATCGGTTTCGGCGGCACTTCCGGCTAC	:	570
Secid3	:	:	570

Fig 1 (continuación)

Secid5 : : 570

	580	*	600	
Secid1	:	GATGCGACTTTGAACGGCAAAGTTTTAGAC	:	600
Secid3	:	:	600
Secid5	:	:	600

	*	620	*	
Secid1	:	TTGGCAATCCGCGAA-CCGTCAACAGCCTG	:	629
Secid3	:G.....	:	630
Secid5	:G.....	:	630

	640	*	660	
Secid1	:	G TTCAGGCTGTTGACAACGGCGCATGGCAA	:	659
Secid3	:	:	660
Secid5	:	:	660

	*	
Secid1	:	CCCAACCGTTAA : 671
Secid3	: : 672
Secid5	: : 672

Figura 2: alineación de las secuencias polipeptídicas de BASB041

La identidad de la SEC ID Nº: 2 está indicada por un punto, y unas comillas ("-") indican un aminoácido ausente.

	*	20	*	
Secid2	:	MKTVSTAVVLAAAVSLTGCATESSRSLEV	:	30
Secid4	:	:	30
Secid6	:	:	30
	40	*	60	
Secid2	:	EKVASYNTQYHGV RTPISVGTFDNRSSFQK	:	60
Secid4	:	:	60
Secid6	:	:	60
	*	80	*	
Secid2	:	GIFSDGEDRLGSQAKTILVTHLQQTNRFNV	:	90
Secid4	:	:	90
Secid6	:	:	90
	100	*	120	
Secid2	:	LNRTNLNALKQESGISGKAHNLKGADYVVT	:	120
Secid4	:	:	120

Fig 2 (continuación)

Secid6 : : 120

* 140 *

Secid2 : GDVTEFGRRDVGDHQLFGILGRGKSQIAYA : 150

Secid4 : : 150

Secid6 : : 150

160 * 180

Secid2 : KVALNIVNVNTSEIVYSAQGAGEYALSNRE : 180

Secid4 : : 180

Secid6 : : 180

* 200 *

Secid2 : IIGFGGTSGYDATLNGKVLDLAIREPSTAW : 210

Secid4 :AVNSL : 210

Secid6 :AVNSL : 210

220

Secid2 : FRLTTAHGNPTV : 223

Secid4 : VQAVDNGAWQ.NR : 223

Secid6 : VQAVDNGAWQ.NR : 223

Figura 3: análisis electroforético de BASB041. A: gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de BASB041. B: inmunodetección del mismo gel usando un reactivo inmunitario anti-tetra-His.

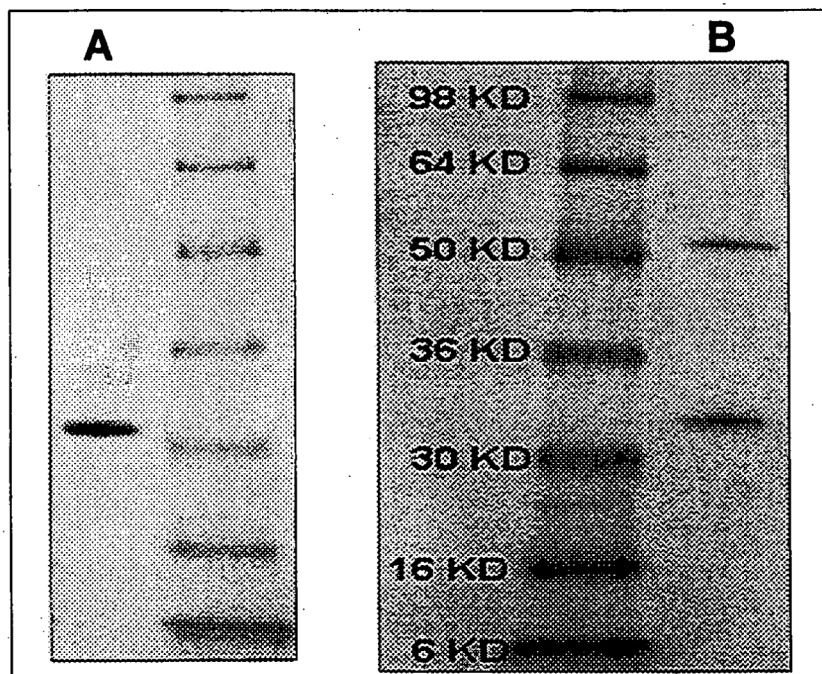


Figura 4: reconocimiento de la proteína BASB041 en varias cepas de *Neisseria meningitidis* con sueros de ratones inmunizados con BASB041.

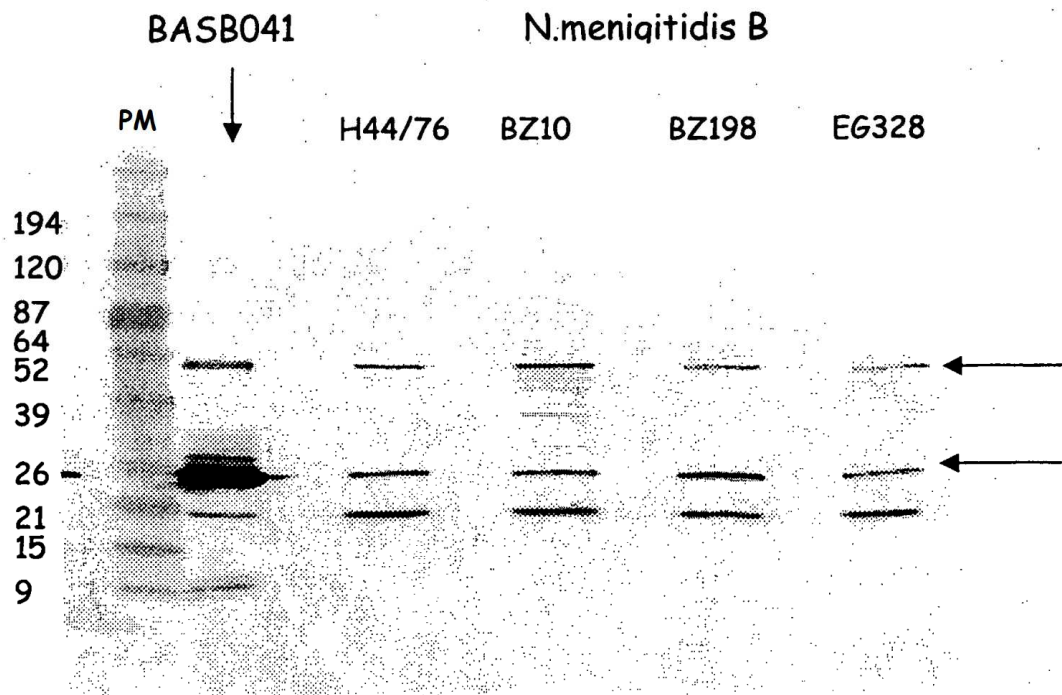


Figura 5: reconocimiento de la proteína BASB041 en varias cepas de *Neisseria meningitidis* B con sueros de ratones inmunizados con BASB041.

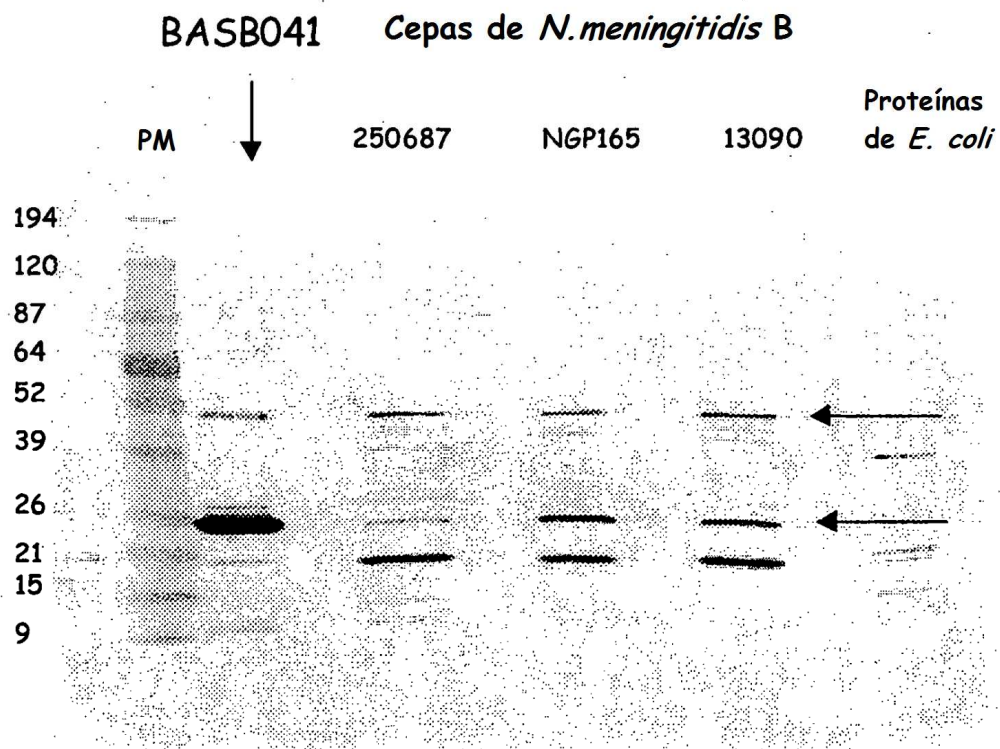


Figura 6: anticuerpos anti-BASB041 en sueros convalecientes y en ratones inmunizados

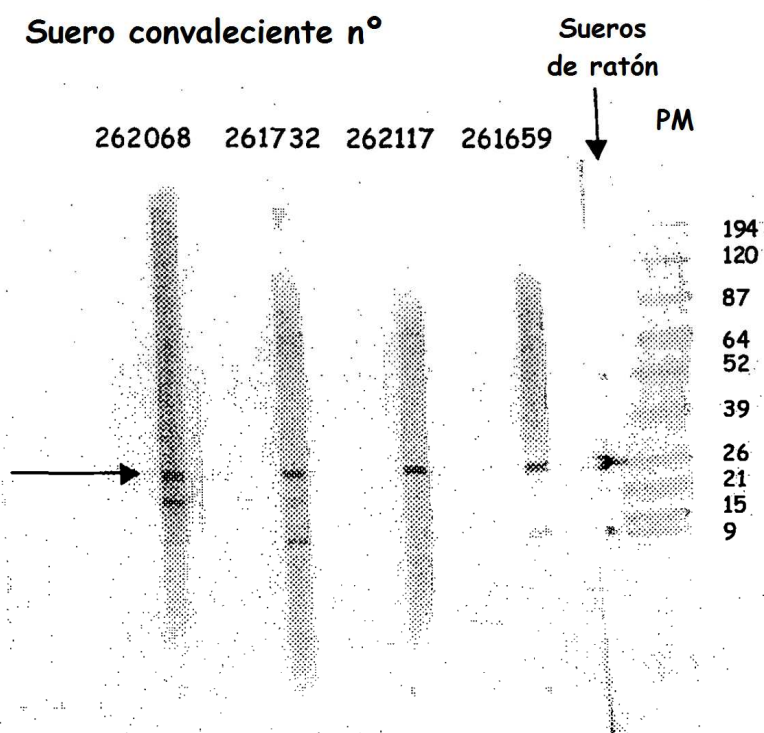


Figura 7: anticuerpos anti-BASB041 en sueros convalecientes y en ratones inmunizados

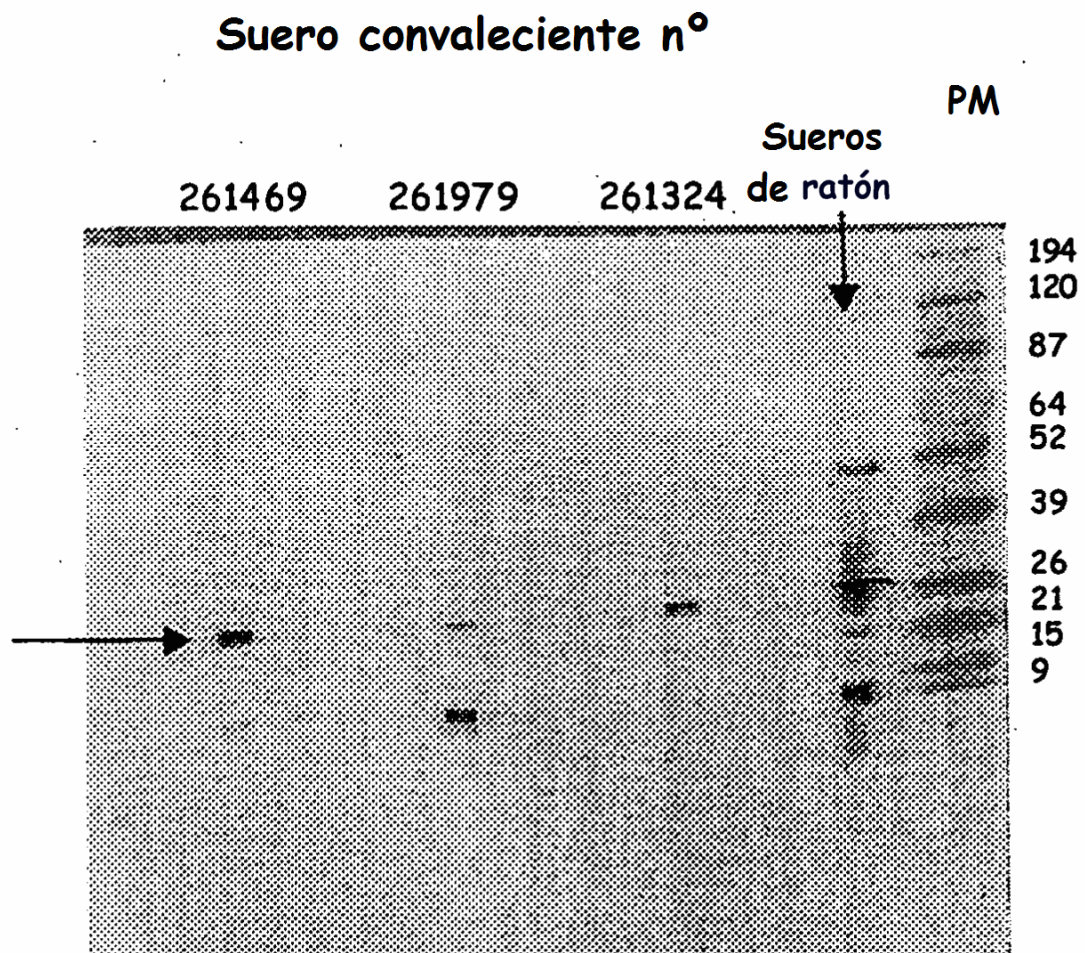


Figura 8: análisis electroforético de BASB043 purificado. A: gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de BASB043. B: inmunodetección del mismo gel usando un reactivo inmunitario anti-tetra-His.

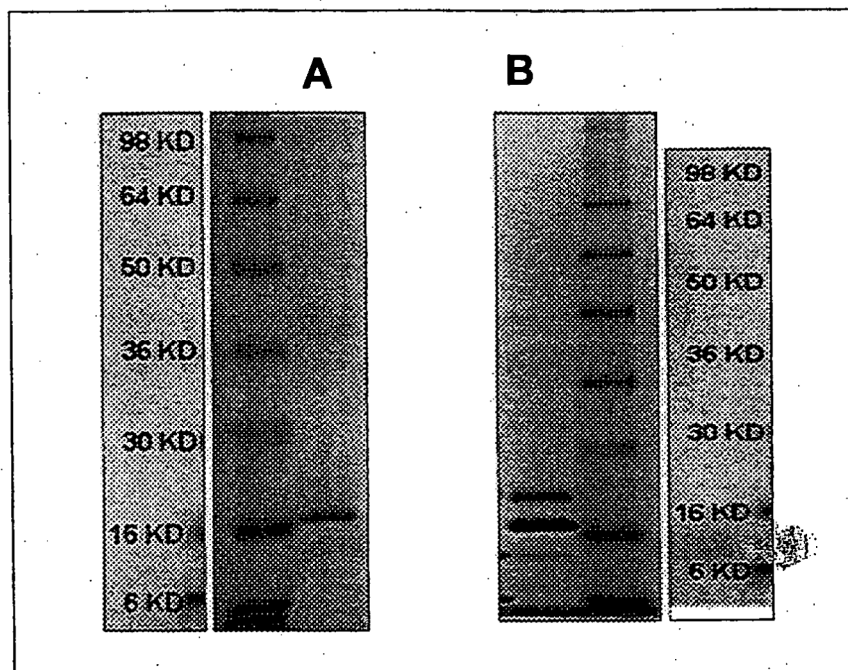


Figura 9: reconocimiento de la proteína BASB043 en varias cepas de *Neisseria meningitidis* con sueros de ratones inmunizados con BASB043.

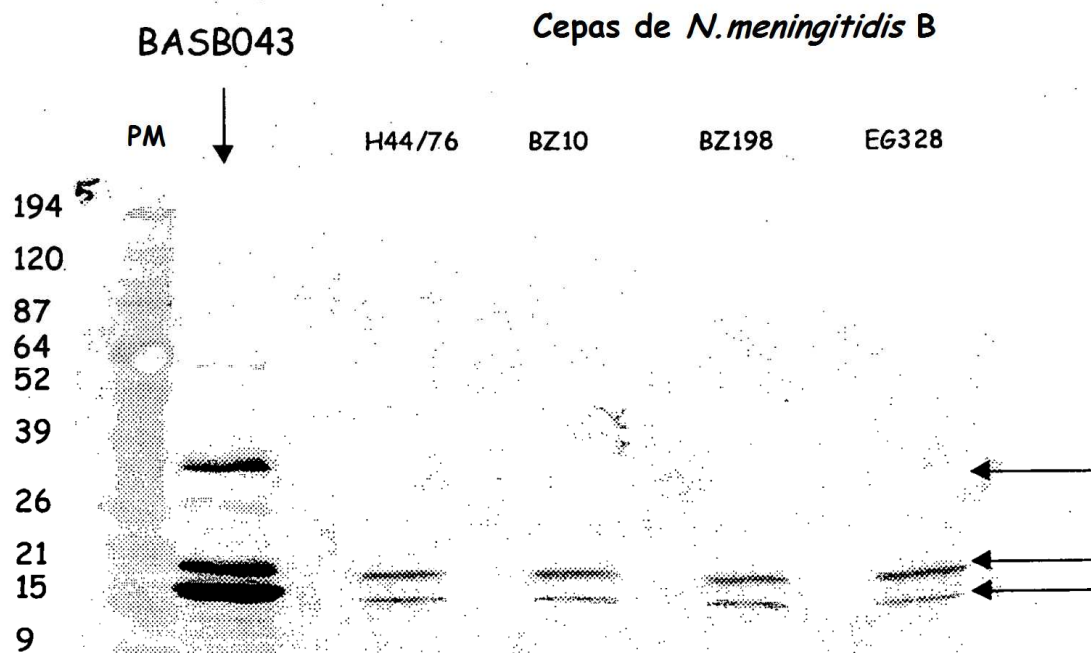


Figura 10: reconocimiento de la proteína BASB043 en varias cepas de *Neisseria meningitidis* con sueros de ratones inmunizados con BASB043.

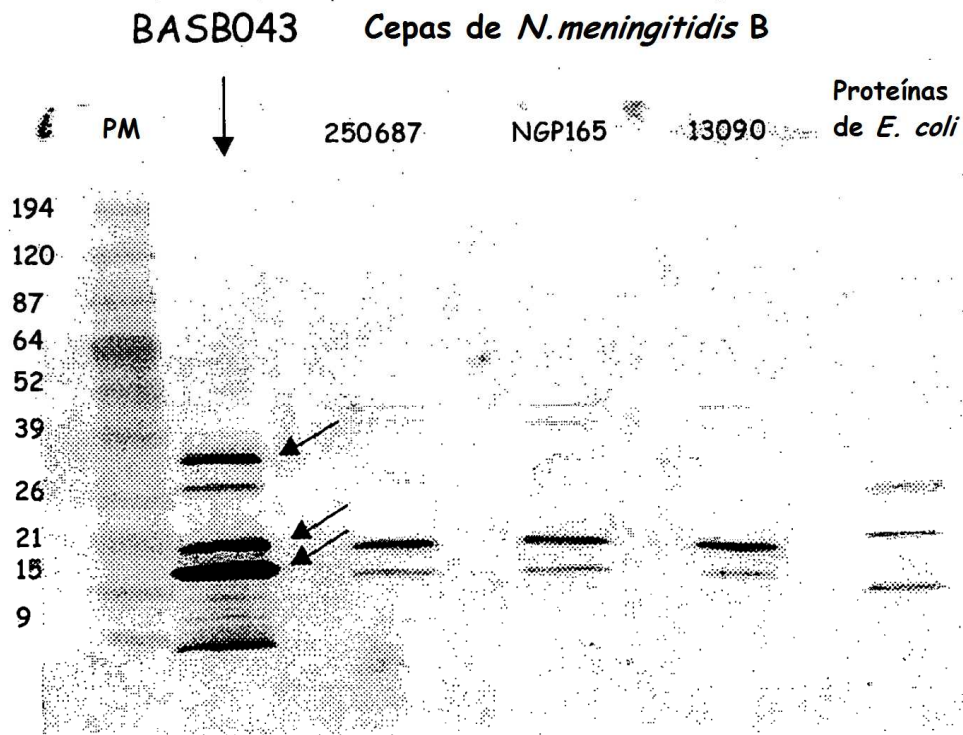


Figura 11: anticuerpos anti-BASB043 en sueros convalecientes y en ratones inmunizados

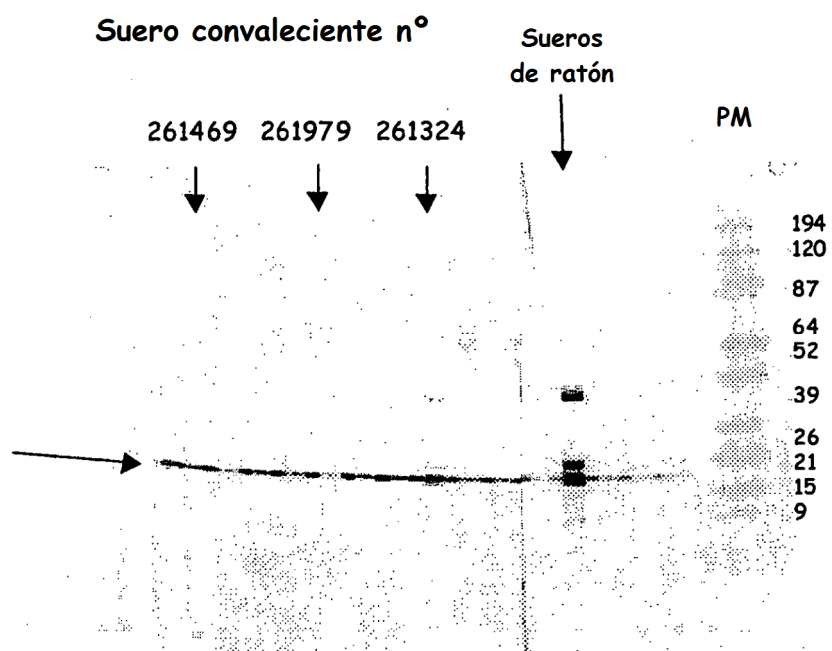


Figura 12: anticuerpos anti-BASB043 en sueros convalecientes y en ratones inmunizados

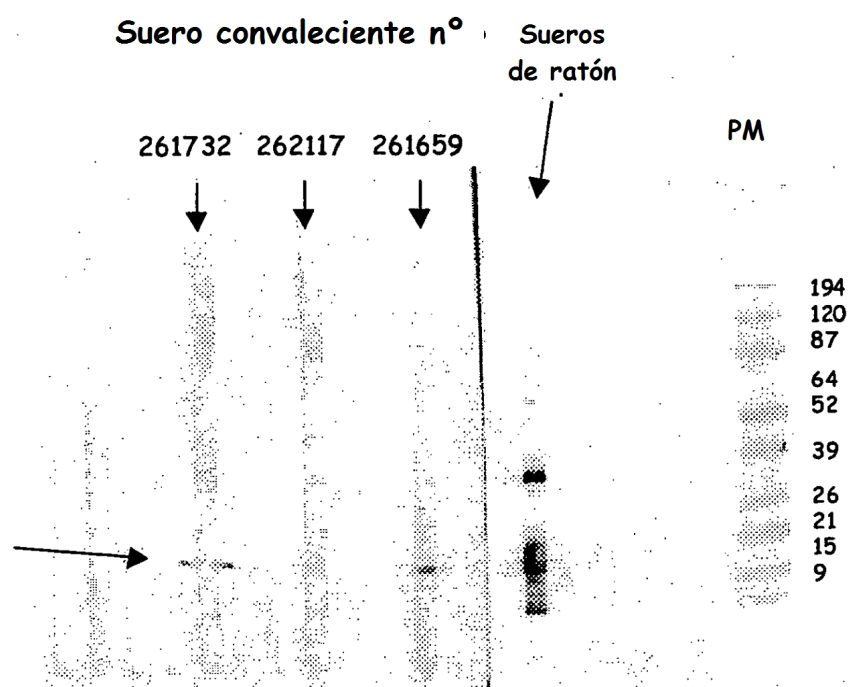


Figura 13: alineación de las secuencias polinucleotídicas de BASB044

La identidad de la SEC ID Nº: 17 está indicada por un punto

	*	20	*	
Secid17 :	ATGACCCCTTCCGCACTGAAAAAAACCGTC	:		30
	40	*	60	
Secid17 :	CTGCTGCTCGGCACTGCCTTTGCCGCCGCA	:		60
	*	80	*	
Secid17 :	TCCGCACAAGCCTCCGGCTACCACTTCGGC	:		90
Secid19 :	:		18
	100	*	120	
Secid17 :	ACACAGTCGGTCAACGCGCAAAGCACGGCA	:		120
Secid19 :	:		48
	*	140	*	
Secid17 :	AATGCCGCCGCCGCAGAAGCCGCCGACGCA	:		150
Secid19 :	:		78
	160	*	180	
Secid17 :	TCGACCATCTTCTACAACCCTGCCGGCCTG	:		180
Secid19 :	:		108
	*	200	*	
Secid17 :	ACCAAACCTCGACAGCAGCCAGATTTCCGTC	:		210
Secid19 :	:		138

Fig 13 (continuación)

	220	*	240	
Secid17	:	AACGCCAACATCGTGCTGCCCAGCATTCAT	:	240
Secid19	:	:	168
		*	260	*
Secid17	:	TATGAGGCGGATTCCGCCACCGACTTTACC	:	270
Secid19	:	:	198
	280	*	300	
Secid17	:	GGGCTTCCCGTCCAAGGTCGAAAAGCGGC	:	300
Secid19	:	:	228
		*	320	*
Secid17	:	AAAATCACCAAACACGGTCGCGCCCCAC	:	330
Secid19	:	:	258
	340	*	360	
Secid17	:	ATCTACGGCGCATACAAAGTCAACGACAAT	:	360
Secid19	:	:	288
		*	380	*
Secid17	:	CTGACCGTAGGCTTGGGCGTGTACGTCCCC	:	390
Secid19	:G.....	:	318
	400	*	420	
Secid17	:	TTCGGTTCTGCCACCGAATACGAAAAAGAT	:	420
Secid19	:C.....	:	348
		*	440	*
Secid17	:	TCCGTGTTGCGCCACAACATCAACAACTC	:	450
Secid19	:	:	378

Fig 13 (continuación)

	460	*	480	
Secid17	:	GGTCTGACCAGCATCGCCGTCGAACCTGTC	:	480
Secid19	:	:	408
		*	500	*
Secid17	:	GCCGCGTGGAAACTCAACGACCGCCATTCC	:	510
Secid19	:	:	438
	520	*	540	
Secid17	:	TTCGGCGCAGGCATCATCGCCCAACATACT	:	540
Secid19	:	:	468
		*	560	*
Secid17	:	TCCGCCGAACTGCGCAAATATGCCGACTGG	:	570
Secid19	:	:	498
	580	*	600	
Secid17	:	GGGATTAAGAGTAAAGCAGAGATATTGACG	:	600
Secid19	:	:	528
		*	620	*
Secid17	:	GCAAAACCGCCCAAACCTAACGGTGTAGCC	:	630
Secid19	:	:	558
	640	*	660	
Secid17	:	GAAGCTGCAAAAATTTCAGGCCGACGGACAC	:	660
Secid19	:	:	588
		*	680	*
Secid17	:	GCCGATGTCAAAGGCAGCGATTGGGGCTTC	:	690
Secid19	:	:	618

Fig 13 (continuación)

	700	*	720	
Secid17	:	GGCTACCAACTGGCGTGGATGTGGGACATC	:	720
Secid19	:	:	648
		*	740	*
Secid17	:	AACGACCGTGCGCGCGTGGGCGTGAACCTAC	:	750
Secid19	:	:	678
	760	*	780	
Secid17	:	CGTTCCAAAGTCTCGCACACGCTCAAAGGC	:	780
Secid19	:	:	708
		*	800	*
Secid17	:	GATGCCGAATGGGCGGCAGACGGCGCGGCG	:	810
Secid19	:	:	738
	820	*	840	
Secid17	:	GCGAAAGCAATGTGGAGTACGATGCTTGCA	:	840
Secid19	:	:	768
		*	860	*
Secid17	:	GCAAACGGCTACACGGCGAATGAAAAAGCC	:	870
Secid19	:	:	798
	880	*	900	
Secid17	:	CGCGTTAAAATCGTTACGCCTGAGTCTTTG	:	900
Secid19	:	:	828
		*	920	*
Secid17	:	TCCGTACACGGTATGTACAAAGTGTCCGAT	:	930

Fig 13 (continuación)

Secid19	:	:	858
		940	*	960
Secid17	:	AAAGCCGACCTGTTCGGCGACGTAACCTTGG	:	960
Secid19	:	:	888
		*	980	*
Secid17	:	ACGCGCCACAGCCGCTTCGATAAGGCGGAA	:	990
Secid19	:	:	918
		1000	*	1020
Secid17	:	CTGGTTTTTGA AAAAAGAAAAAACCGTCGTC	:	1020
Secid19	:	:	948
		*	1040	*
Secid17	:	AAAGGCAAATCCGACCGCACCACCATCACC	:	1050
Secid19	:	:	978
		1060	*	1080
Secid17	:	CCCAACTGGCGCAACACCTACAAAGTCGGC	:	1080
Secid19	:	:	1008
		*	1100	*
Secid17	:	TTCGGCGGTTCTTATCAAATCAGCGAACCG	:	1110
Secid19	:	:	1038
		1120	*	1140
Secid17	:	CTGCAACTGCGCGCCGGCATCGCTTTTGAC	:	1140
Secid19	:	:	1068
		*	1160	*

Fig 13 (continuación)

Secid17 : AAATCGCCCGTCCGCAACGCCGACTACCGC : 1170
 Secid19 : : 1098

 1180 * 1200
 Secid17 : ATGAACAGCCTGCCCCGACGGCAACCGCATC : 1200
 Secid19 :A..... : 1128

 * 1220 *
 Secid17 : TGGTTCTCCGCCGGTATGAAATACCATATC : 1230
 Secid19 : : 1158

 1240 * 1260
 Secid17 : GGTAAAAACACGTCGTCGATGCCGCCTAC : 1260
 Secid19 : : 1188

 * 1280 *
 Secid17 : ACCCACATCCACATCAACGACACCACCTAC : 1290
 Secid19 :G.... : 1218

 1300 * 1320
 Secid17 : CGCACGGCGAAGGCAAGCGGCAACGATGTG : 1320
 Secid19 : : 1248

 * 1340 *
 Secid17 : GACAGCAAAGGCGCGTCTTCCGCACGTTTC : 1350
 Secid19 : : 1278

 1360 * 1380
 Secid17 : AAAAACCACGCCGACATCATCGGCCTGCAA : 1380
 Secid19 :T..... : 1308

Fig 13 (continuación)

	*	1400	
Secid17	:	TACACCTACAAATTCAAATAA	: 1401
Secid19	:	: 1329

Figura 14: alineación de las secuencias polipeptídicas de BASB044.

La identidad de la ID. SEC. Nº: 18 está indicada por un punto

```

                *           20           *
Secid18 : MTPSALKKTVLLLGTAFAAASAQASGYHFG : 30
Secid20 : ..... : 6

```

```

                40           *           60
Secid18 : TQSVNAQSTANAAAAEAADASTIFYNPAGL : 60
Secid20 : ..... : 36

```

```

                *           80           *
Secid18 : TKLDSSQISVNANIVLPSIHYEADSATDFT : 90
Secid20 : ..... : 66

```

```

                100           *           120
Secid18 : GLPVQGSKSGKITKTTVAPHIYGAYKVNDN : 120
Secid20 : ..... : 96

```

```

                *           140           *

```

Fig 14 (continuación)

Secid18 : LTVGLGVYVPFGSATEYEKDSVLRHNINKL : 150

Secid20 : : 126

160 * 180

Secid18 : GLTSIAVEPVAAWKLNDRHSFGAGIIAQHT : 180

Secid20 : : 156

* 200 *

Secid18 : SAELRKYADWGIKSKAEILTAKPPKPNGVA : 210

Secid20 : : 186

220 * 240

Secid18 : EAAKIQADGHADVKGSDWGFGYQLAWMWDI : 240

Secid20 : : 216

* 260 *

Secid18 : NDRARVGVNYRSKVSHTLKGDAEWAADGAA : 270

Secid20 : : 246

280 * 300

Secid18 : AKAMWSTMLAANGYTANEKARVKIVTPESL : 300

Fig 14 (continuación)

Secid20 : : 276

* 320 *

Secid18 : SVHGMVKVSDKADLFGDVTWTRHSRFDKAE : 330

Secid20 : : 306

340 * 360

Secid18 : LVFEKEKTVVKGKSDRTTITPNWRNTYKVG : 360

Secid20 : : 336

* 380 *

Secid18 : FGGSYQISEPLQLRAGIAFDKSPVRNADYR : 390

Secid20 : : 366

400 * 420

Secid18 : MNSLPDGNRIWFSAKMKYHIGKNHVVDAAAY : 420

Secid20 : : 396

* 440 *

Secid18 : THIHINDTTYRTAKASGNDVDSKGASSARF : 450

Secid20 :S..... : 426

Fig 14 (continuación)

460

Secid18 : KNHADIIGLQYTYKFK : 466

Secid20 : : 442