

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 719**

51 Int. Cl.:
C07K 14/22 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01946868 .5**
96 Fecha de presentación: **25.01.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1252182**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.10.2002**

54 Título: **Proteínas que comprenden regiones conservadas del antígeno de superficie de Neisseria meningitidis NhHA**

30 Prioridad:
25.01.2000 US 177917 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.10.2012

73 Titular/es:
THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND (100.0%)
St Lucia
Brisbane, QLD 4072 , AU

72 Inventor/es:
PEAK, IAN RICHARD ANSELM y
JENNINGS, MICHAEL PAUL

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

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

ES 2 389 719 T3

DESCRIPCIÓN

Proteínas que comprenden regiones conservadas del antígeno de superficie de *Neisseria meningitidis* NhhA.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a proteínas nuevas que constituyen formas modificadas de un antígeno de superficie de *Neisseria meningitidis*, a ácidos nucleicos que codifican tales péptidos y polipéptidos nuevos, y al uso de estos en diagnóstico, en vacunas terapéuticas y profilácticas y en el diseño y/o cribado de medicamentos. Más particularmente, al tener deleciones de aminoácidos no conservados, los antígenos de superficie modificados de la invención pueden ser útiles en vacunas que inmunizan eficazmente contra un espectro más amplio de cepas de *N. meningitidis* del que se esperaría de un antígeno de superficie salvaje correspondiente.

15 **Antecedentes de la invención**

Neisseria meningitidis es una bacteria Gram negativa y el agente causante de la meningitis meningocócica y septicemia. Su único huésped conocido es el ser humano, y la puede llevar asintóticamente aproximadamente el 10% de la población (Caugant *et al.*, 1994, Journal of Clinical Microbiology **32** 323).

20 *N. meningitidis* puede expresar una cápsula de polisacáridos y esto permite la clasificación de las bacterias según la naturaleza de la cápsula expresada. Hay al menos doce serogrupos de *N. meningitidis*: A, B, C, 29-E, H, I, K, L, W135, X, Y y Z, de los cuales los serogrupos A, B y C causan el 90% de la enfermedad meningocócica (Poolman *et al.*, 1995, Infectious Agents and Disease **4** 13). Las vacunas dirigidas contra los serogrupos A y C están disponibles, pero el polisacárido capsular del serogrupo B es poco inmunogénico y no induce protección en seres humanos.

25 Por tanto, se está examinando la idoneidad de otros componentes de membrana y extracelulares para su inclusión en vacunas. Los ejemplos incluyen las proteínas de la membrana externa de clases 1, 2 y 3 (porina; codificada por los genes *por*) y las clases 4 (Rmp) y 5 (proteínas de opacidad; codificadas por los genes *opa* y *opc*).

30 Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de estos candidatos es capaz de inducir protección completa, particularmente en niños (Romero *et al.*, 1994, Clinical Microbiology Review, **7** 559; Poolman *et al.*, 1995, anteriormente).

35 Para crear una vacuna eficaz, es necesario identificar componentes de *N. meningitidis* que estén presentes en una mayoría de cepas, y que sean capaces de inducir una respuesta inmune protectora (por ejemplo, anticuerpos bactericidas).

A este respecto, se hace referencia a las publicaciones internacionales WO 99/24578, WO99/36544, WO99/58683 y WO99/57280, cada una de las cuales describe un número de proteínas candidatas que podrían ser útiles en vacunas para inmunizar contra *Neisseria meningitidis*.

40 A este respecto, se hace referencia particular a la publicación internacional WO99/31132 y Peak *et al.* 2000, FEMS Immunol. Med. Microbiol. **28** 329, cada una de las cuales describe un antígeno de superficie nuevo aislado de un número de diferentes cepas de *N. meningitidis*, antígeno de superficie, y variantes alélicas del mismo, que para los fines de esta especificación se denominarán como NhhA.

45 **Compendio de la invención**

Los inventores presentes han descubierto que el antígeno de superficie NhhA tiene regiones polipeptídicas que son variables entre cepas de *N. meningitidis*, y otras regiones que están conservadas entre cepas. Las regiones variables pueden ser inmunogénicas y tienden a inducir respuestas inmunes específicas de la cepa, de modo que las vacunas que incorporan un antígeno NhhA derivado de una cepa particular de *N. meningitidis* tienden a inmunizar preferentemente contra esa cepa particular. Como resultado, los presentes inventores han intentado producir un polipéptido NhhA modificado que induzca una respuesta inmune que no sea tan específica de cepa como la inducida por NhhA salvaje. Este antígeno NhhA modificado será útil para la producción de vacunas terapéuticas y/o profilácticas contra *N. meningitidis* como se describirá en el presente documento posteriormente. Al dirigir la respuesta inmune principalmente contra epítomos conservados, tales vacunas deben inmunizar eficazmente contra un espectro más amplio de cepas de *N. meningitidis* del que se esperaría después de la inmunización con NhhA salvaje.

60 La presente invención, por tanto, se dirige en general a proteínas aisladas que tienen aminoácidos conservados de polipéptidos NhhA.

Por tanto, las proteínas de la invención tienen una o más deleciones de aminoácidos no conservados comparados con un polipéptido NhhA salvaje correspondiente.

65 En un primer aspecto, la invención proporciona una proteína aislada seleccionada de

- (a) una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; o
- (b) una proteína aislada que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, que son "*polipéptidos NhhA modificados de la invención*".

5 La respuesta inmune es menos específica de cepa que la provocada por dicho polipéptido NhhA salvaje correspondiente.

Las secuencias de polipéptidos NhhA salvajes se ejemplifican en la figura 1 (SEQ ID NO: 1 a 10).

10 También se muestra una secuencia consenso de aminoácidos en la figura 1 (SEQ ID NO: 11).

Las regiones constantes de un polipéptido NhhA se designan regiones C1, C2, C3, C4 y C5 en la figura 1.

Las regiones variables de un polipéptido NhhA se designan como regiones V1, V2, V3 o V4 en la figura 1.

15 Preferiblemente, una región V1, o al menos una parte sustancial de la misma, se deletiona.

También se describen proteínas aisladas que tienen una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las figuras 6 a 9 (SEQ ID NO: 24 a 27). En la figura 14 (SEQ ID NO: 33 a 39) se proporcionan ejemplos adicionales de polipéptidos "maduros" que se predice que resultan de la eliminación de las secuencias señal N-terminal.

20 Según un segundo aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido según el primer aspecto.

25 Las secuencias de ácido nucleico *nhhA* salvaje se ejemplifican en la figura 2 (SEQ ID NO: 12 a 21).

También se muestra una secuencia consenso de ácido nucleico en la figura 2 (SEQ ID NO: 22).

30 Preferiblemente las regiones C1, C2, C3, C4 y C5 están codificadas por las respectivas secuencias de nucleótidos como se muestran en la figura 2.

Preferiblemente las regiones V1, V2, V3 y V4 están codificadas por las respectivas secuencias de nucleótidos como se muestran en la figura 2.

35 En una forma de realización particular, el ácido nucleico aislado de la invención tiene una secuencia de nucleótidos como se muestra en la figura 5 (SEQ ID NO: 28) que es un ejemplo particular del "*ácido nucleico nhhA modificado de la invención*". Se describen ácidos nucleicos adicionales en las figuras 6 a 9 (SEQ ID NO: 29 a 32), que son ejemplos particulares de los "*ácidos nucleicos nhhA modificados de la invención*".

40 La invención según el primer y segundo aspectos se extiende a proteínas de fusión que consisten en la proteína aislada del primer aspecto y un compañero de fusión que no deriva de *N. meningitidis* y ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas.

45 Específicamente excluidos del ámbito de la invención están los polipéptidos NhhA y los ácidos nucleicos *nhhA* salvajes.

50 En un tercer aspecto, la invención reside en una construcción de expresión que comprende un vector de expresión y un ácido nucleico según el segundo aspecto, en donde dicha secuencia está operativamente unida a uno o más ácidos nucleicos reguladores en dicho vector de expresión.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula huésped que contiene una construcción de expresión según el tercer aspecto.

55 En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un método de producir una proteína aislada recombinante según el primer aspecto, dicho método comprende los pasos de:

- (i) cultivar una célula huésped que contiene un vector de expresión según el tercer aspecto de modo que dicho polipéptido se exprese en dicha célula huésped; y
- 60 (ii) aislar dicho polipéptido recombinante.

También se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una proteína de la invención, fragmento, variante o derivado de la misma.

65 También se describe un método de detectar *N. meningitidis* en una muestra biológica que se sospecha que contiene la misma, dicho método comprende los pasos de:

- (i) aislar la muestra biológica de un individuo;
- (ii) combinar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo mencionado anteriormente con la muestra biológica; y
- (iii) detectar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo específicamente unido que indica la presencia de *N. meningitidis*.

5 También se describe un método de detectar bacterias *N. meningitidis* en una muestra biológica que se sospecha que contiene la misma, dicho método comprende los pasos de:

- (i) aislar la muestra biológica de un paciente;
- (ii) detectar una secuencia de ácido nucleico según el segundo aspecto mencionado en dicha muestra que indica la presencia de dichas bacterias.

10 En un sexto aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar la infección de un individuo por *N. meningitidis*, dicho método comprende los pasos de:

- (i) poner en contacto un muestra biológica de un individuo con una proteína aislada o proteína de fusión de la invención; y
- (ii) determinar la presencia o ausencia de un complejo entre dicha proteína aislada o proteína de fusión y anticuerpos específicos de *N. meningitidis* en dicha muestra, en donde la presencia del dicho complejo es indicativa de dicha infección.

15 Preferiblemente, el individuo es un mamífero.

Más preferiblemente, el individuo es un ser humano.

25 También se describe el uso de una proteína aislada según el primer aspecto mencionado, el uso de ácidos nucleicos según el segundo aspecto o el uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo mencionado anteriormente en un kit para detectar bacterias *N. meningitidis* en una muestra biológica.

30 En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína aislada según el primer aspecto mencionado.

Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es una vacuna.

35 También se describe un método de prevenir la infección de un paciente por *N. meningitidis*, que comprende el paso de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de la vacuna anteriormente mencionada.

También se describe un método de identificar un fragmento inmunógeno de una proteína aislada según el primer aspecto mencionado, que comprende los pasos de:

- (i) producir un fragmento de dicho polipéptido;
- (ii) administrar dicho fragmento a un individuo; y
- (iii) detectar una respuesta inmune en dicho individuo, respuesta que incluye la producción de elementos que específicamente se unen a *N. meningitidis* y/o dicho polipéptido y/o un efecto protector contra la infección por *N. meningitidis*.

45 Preferiblemente, el individuo es un mamífero.

Más preferiblemente, el individuo es un ser humano.

50 **Breve descripción de las figuras y tablas**

Tabla 1: Identificación de los aminoácidos de las regiones conservadas (C1, C2, C3, C4 y C5) y las regiones variables (V1, V2, V3 y V4) de un polipéptido NhhA de cada una de las diez (10) cepas indicadas de *N. meningitidis*. También se indican las SEQ ID NO relevantes. Columna 1 = designación de la cepa. Las SEQ ID NO: 1-9 se describieron previamente en la solicitud en tramitación junto a esta WO99/31132; las secuencia de NhhA y *nhhA* de la cepa Z2491 se obtuvieron de http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis/; columna 2 = numeración de aminoácidos de la región C1; columna 3 = numeración de aminoácidos de la región V1; columna 4 = numeración de aminoácidos de la región C2; columna 5 = numeración de aminoácidos de la región V2; columna 6 = numeración de aminoácidos de la región C3; columna 7 = numeración de aminoácidos de la región V2; columna 8 = numeración de aminoácidos de la región C4; columna 9 = numeración de aminoácidos de la región V4; columna 10 = numeración de aminoácidos de la región C5. Nótese que también se indica la numeración de aminoácidos de la secuencia consenso (SEQ ID NO: 11) también se indica.

Tabla 2: Tabla de sustituciones de aminoácidos.

Figura 1: Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de polipéptidos NhhA de diez (10) cepas de *N. meningitidis* (SEQ ID NO: 1-10) junto con la secuencia consenso (SEQ ID NO: 11). Los nombres de las cepas y las secuencias de los polipéptidos usados en este alineamiento corresponden a los nombres de las cepas y SEQ ID NO en la columna 1 de la tabla 1. Los aminoácidos se indican por las abreviaturas de única letra estándar. Los aminoácidos consenso se muestran solo donde los residuos están completamente conservados. Las regiones conservadas (subrayado doble, marcadas C1, C2, C3, C4, C5) y las regiones variables (subrayado sencillo, marcadas V1, V2, V3, V4) se indican bajo la secuencia consenso. Las secuencias de aminoácidos en esta figura se designan consistente con la tabla 1 como sigue: PMC21 = SEQ ID NO: 1; H41 = SEQ ID NO: 2; P20 = SEQ ID NO:3; EG327 = SEQ ID NO:4; EG329 = SEQ ID NO:5; H38 = SEQ ID NO:6; H15 = SEQ ID NO: 7; BZ10 = SEQ ID NO:8; BZ198 = SEQ ID NO:9; Z2491 = SEQ ID NO:10; y secuencia consenso = SEQ ID NO: 11.

Figura 2: Alineamiento de secuencias de nucleótidos de ácidos nucleicos *nhhA* de diez (10) cepas de *N. meningitidis*, secuencias que codifican las secuencias de aminoácidos de la figura 1. Las regiones C1, C2, C3, C4, C5 y V1, V2, V3, V4 son como se describen en la figura 1 y la tabla 1. Las secuencias de ácido nucleico en esta figura se designan como sigue: PMC21 = SEQ ID NO: 12; H41 = SEQ ID NO: 13; P20 = SEQ ID NO:14; EG327 = SEQ ID NO:15; EG329 = SEQ ID NO:16; H38 = SEQ ID NO:17; H15 = SEQ ID NO: 18; BZ10 = SEQ ID NO:19; BZ198 = SEQ ID NO:20; Z2491 = SEQ ID NO:21; y secuencia consenso = SEQ ID NO: 22.

Figura 3: Mapa plasmídico correspondiente a pCO14K con un producto de amplificación por PCR que codifica NhhA de PMC21 salvaje operativamente unido al promotor *porA*. (No dibujado a escala). 3A: Las flechas de trazo grueso indican la organización de los genes *porA* y *kanR* en pCO14K. Se muestran los cebadores oligonucleotídicos HOMP5' y HOMP3'AN usados para amplificar el gen *nhhA* de la cepa PMC21. El gen *nhhA* se muestra mediante una flecha de puntos, el promotor *porA* mediante una caja negra, y se muestran los sitios de restricción *EagI* y *NcoI* usados para sustituir *porA* con *nhhA* como se describe en el ejemplo 2. 3B Organización de genes en pIP52(PMC21), como se describe en el ejemplo 2. Se muestra el sitio *BglII* usado para construir un mutante como se describe en el ejemplo 4.

Figura 4: Representación esquemática de la estrategia de PCR por extensión de solapamiento de ajuste para la delección de regiones específicas de polipéptidos NhhA. Se muestra un esquema del gen *nhhA* salvaje en la parte superior de las figuras 4A-C, y se muestra *nhhA* recombinante en la parte inferior de esas figuras, con las regiones variables mostradas como cajas negras y las regiones constantes como cajas vacías. Las flechas indican la localización aproximada de los cebadores oligonucleotídicos. Las líneas con trazos verticales indican productos de amplificación. Donde la secuencia de oligonucleótidos es de regiones discontinuas de un ácido nucleico *nhhA*, esto se muestra por una línea de puntos entre tales regiones discontinuas. Escala aproximada indicada. Las líneas verticales dobles indican que solo se muestra una parte de la región C5. A: muestra la estrategia como se describe en el ejemplo 6. B: muestra la estrategia como se describe en el ejemplo 7. C: muestra la estrategia como se describe en el ejemplo 8.

Figura 5: (A) secuencia de aminoácidos del polipéptido mutante de delección de NhhA de PMC 21 (SEQ ID NO: 23) producido en el ejemplo 4; y (B) secuencia de nucleótidos codificante (SEQ ID NO: 28).

Figura 6: (A) secuencia de aminoácidos del polipéptido mutante de delección de NhhA de H41 (SEQ ID NO: 24) producido en el ejemplo 5; y (B) secuencia de nucleótidos codificante (SEQ ID NO: 29).

Figura 7: (A) secuencia de aminoácidos del polipéptido mutante de delección de NhhA de PCM21 (SEQ ID NO: 25) producido por PCR de solapamiento por ajuste en el ejemplo 6; y (B) secuencia de nucleótidos codificante (SEQ ID NO: 30).

Figura 8: (A) secuencia de aminoácidos del polipéptido mutante de delección de NhhA de PCM21 (SEQ ID NO: 26) producido por PCR de solapamiento por ajuste en el ejemplo 7; y (B) secuencia de nucleótidos codificante (SEQ ID NO: 31).

Figura 9: (A) secuencia de aminoácidos del polipéptido mutante de delección de NhhA de PCM21 (SEQ ID NO: 27) producido por PCR de solapamiento por ajuste en el ejemplo 8; y (B) secuencia de nucleótidos codificante (SEQ ID NO: 32).

Figura 10: Alineamientos de secuencias de aminoácidos de las secuencias de mutantes de delección de NhhA y salvaje. Estos polipéptidos se produjeron como se describe en el ejemplo 2, ejemplo 3, ejemplo 4 y ejemplo 5. Los aminoácidos se indican por la abreviatura de una letra. Las regiones conservadas marcadas C1, C2, C3, C4 y C5 correspondientes a las definidas en la tabla 1 y la figura 1 se indican por un subrayado doble de las secuencias de longitud completa de H41 y PMC21, y las regiones variables marcadas V1, V2, V3 y V4 correspondientes a las definidas en la tabla 1 y la figura 1 se indican por un subrayado sencillo de las secuencias de longitud completa de H41 y PMC21.

Figura 11: Inmunotransferencia que muestra NhhA sobreexpresada. Se separaron 45 µg de proteína celular total en un SDS-PAGE en gradiente del 4-20% antes de transferir a un filtro de nitrocelulosa e inmunotransferencia como se describe en el ejemplo 9. Carril 1: Cepa parental que muestra el nivel salvaje de expresión de NhhA. Carril 2: Cepa P6 (sobreexpresa NhhA de PMC 21 como se describe en el ejemplo 2). Carril 3: Cepa PΔ6 (sobreexpresa NhhA truncada de PMC 21 como se describe en el ejemplo 3). Carril 4: Cepa H14 (sobreexpresa NhhA de H41 descrita en el ejemplo 3). Carril 5: Cepa HΔ8 (sobreexpresa NhhA truncada de H41 descrita en el ejemplo 5). Carril 6: cepa 2A (expresión de NhhA eliminada por mutación del gen *nhhA* como se describe en la publicación internacional WO99/31132). Se indica la migración de los estándares: 185 kDa, 119 kDa, 85 kDa, 62 kDa, 51,2 kDa, 38,2 kDa, 22,4 kDa. El polipéptido NhhA salvaje está presente como una banda inmunorreactiva de alto peso molecular presente en el carril 1 pero ausente del carril 6.

Figura 12: Polipéptidos mutantes de delección de NhhA aislados. Los polipéptidos NhhA se aislaron como se describe en el ejemplo 9 antes de su separación en SDS-PAGE del 4-20%. El gel de poliacrilamida se tiñó con Coomassie. Carril 1: Preparación OMC de la cepa que sobreexpresa el polipéptido NhhA de PMC21 truncado descrito en el ejemplo 6. Carril 2: Polipéptido NhhA de PMC21 truncado purificado. Carril 3: Preparación OMC de la cepa que sobreexpresa el polipéptido NhhA de PMC21 truncado descrito en el ejemplo 4. Carril 4: Polipéptido NhhA de PMC21 truncado purificado. Carril 5: Preparación OMC de una cepa que sobreexpresa el polipéptido NhhA de PMC21 descrito en el ejemplo 2. Carril 6: Polipéptido NhhA de PMC21 purificado. Carril 7: Marcadores de peso molecular de 173 kDa, 111 kDa, 80 kDa, 61 kDa, 49 kDa, 36 kDa. Nótese que la especie reactiva de alto peso molecular en todos los carriles excepto el 6 probablemente representa multímeros de polipéptidos NhhA. Otras bandas son probablemente formas menos estables de NhhA o productos de degradación. Nótese que estos están ausentes del carril 6.

Figura 13: Inmunotransferencia usando suero de ratón anti-proteína NhhA. En todos los paneles, los carriles 1, 3, 5, 7 contienen OMC de la cepa que sobreexpresa el polipéptido NhhA, y los carriles 2, 4, 6 y 8 contienen OMC de la cepa 2A que no expresa NhhA. Panel A: Carriles 1 y 2: ratón A inoculado con NhhA de PMC21 salvaje a una dilución 1:1000. Carriles 3 y 4: ratón A inoculado con NhhA de PMC21 salvaje a una dilución 1:10.000. Carriles 5 y 6, ratón B inoculado con NhhA de PMC21 salvaje a una dilución 1:1000. Carriles 7 y 8: ratón B inoculado con NhhA de PMC21 salvaje a una dilución 1:10.000. Panel B: Carriles 1 & 2: ratón C inoculado con el polipéptido NhhA de PMC21 truncado (ejemplo 4) a una dilución 1:1000. Carriles 3 & 4: ratón C inoculado con el polipéptido NhhA de PMC21 truncado (ejemplo 4) a una dilución 1:10.000. Carriles 5 & 6: ratón D inoculado con el polipéptido NhhA de PMC21 truncado (ejemplo 4) a una dilución 1:1000. Carriles 7 y 8: ratón D inoculado con el polipéptido NhhA de PMC21 truncado (ejemplo 4) dilución 1:1000. Panel C: Carriles 1 & 2: ratón E inoculado con NhhA de PMC21 truncado (ejemplo 6) a una dilución 1:1000. Carriles 3 y 4: ratón E inoculado con NhhA de PMC21 truncado (ejemplo 6) a una dilución 1:10.000. Carriles 5 & 6: ratón F inoculado con NhhA de PMC21 truncado (ejemplo 6) a una dilución 1:1000. Carriles 7 y 8: ratón F inoculado con NhhA de PMC21 truncado (ejemplo 6) a una dilución 1:1000.

Figura 14: Mutantes de delección del polipéptido NhhA maduro predichos. A: proteína madura predicha descrita en el ejemplo 2 (SEQ ID NO: 33); B: proteína madura predicha descrita en el ejemplo 3 (SEQ ID NO: 34); C: proteína madura predicha descrita en el ejemplo 4 (SEQ ID NO: 35); D: proteína madura predicha descrita en el ejemplo 5 (SEQ ID NO: 36); E: proteína madura predicha descrita en el ejemplo 6 (SEQ ID NO: 37); F: proteína madura predicha descrita en el ejemplo 7 (SEQ ID NO: 38); y G: proteína madura predicha descrita en el ejemplo 8 (SEQ ID NO: 39).

Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, se entenderá que las palabras "comprender", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un entero o grupo de enteros indicados pero no la exclusión de cualquier otro entero o grupo de enteros.

Con respecto a la nomenclatura, NhhA se usa en el presente documento cuando se hace referencia a proteínas de la invención, mientras que *nhhA* se usa en el presente documento cuando se hace referencia a ácidos nucleicos de la invención. También se entenderá que las proteínas y ácidos nucleicos NhhA/*nhhA* incluyen las proteínas y ácidos nucleicos HiaNm/*hianm* referidos en el documento WO99/31132, por ejemplo, sin limitación a los mismos.

La presente invención se basa, al menos en parte, en la elucidación de regiones conservadas y menos conservadas en el polipéptido NhhA en diez (10) cepas de *N. meningitidis*. Se predice que las regiones correspondientes estén conservadas en otras variantes alélicas de los polipéptidos NhhA ejemplificados.

Se apreciará que es central a la presente invención la realización de que mediante la delección de aminoácidos no conservados en un polipéptido NhhA salvaje para formar un polipéptido NhhA modificado de la invención, se puede provocar una respuesta inmune tras la inmunización por dicho polipéptido de la invención que, al dirigir la respuesta inmune contra epítopos conservados, proporcionará protección contra una o más cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

Como se usa en el presente documento, aminoácidos “no conservados” son residuos de aminoácidos presentes en un polipéptido NhhA salvaje de una primera cepa de *N. meningitidis*, pero que no están presentes en un polipéptido NhhA salvaje de una o más otras cepas.

5 Adecuadamente, los polipéptidos que tienen al menos una parte de una de las regiones V1, V2, V3 o V4 delecionada con respecto a la secuencia salvaje correspondiente se pueden denominar colectivamente como ejemplos de “mutantes de deleción”.

10 Se apreciará que los inventores presentes han identificado las regiones V1, V2, V3 y V4 como que son regiones de los polipéptidos NhhA salvajes que tienen frecuencias relativamente altas de aminoácidos no conservados comparadas con las regiones relativamente conservadas C1-C5.

15 De las regiones V, las regiones V1 (hipervariable) y V2 tienen la frecuencia más alta de aminoácidos no conservados, mientras que V3 y V4 tienen frecuencias relativamente más bajas. Sin embargo, la región V1 constituye una proporción más significativa de los polipéptidos NhhA salvajes que la región V2 (en términos de aminoácidos totales). Las proteínas aisladas según el primer aspecto mencionado tienen una parte sustancial de la región V1 delecionada.

20 Para los fines de esta invención, mediante “aislado” se quiere decir material que se retirado de su estado natural o se ha sometido de otra manera a manipulación humana. El material aislado puede estar sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural, o puede estar manipulado de modo que esté en un estado artificial junto con componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. El material aislado puede estar en forma nativa o recombinante.

25 Mediante “proteína” se quiere decir un polímero de aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales o no naturales como se entiende bien en la técnica.

Un “péptido” es una proteína que tiene no más de cincuenta (50) aminoácidos.

30 Un polipéptido es una proteína que tiene cincuenta (50) o más aminoácidos.

35 Como se usa en el presente documento, la frase “provoca una respuesta inmune” se refiere a la capacidad de un polipéptido aislado de la invención para producir una respuesta inmune en un mamífero al que se administra, en donde la respuesta se dirige a *N. meningitidis* y/o dicho polipéptido. Preferiblemente, la respuesta inmune incluye la producción de anticuerpos bactericidas. Más preferiblemente, la respuesta inmune es protectora contra la infección por *N. meningitidis*.

40 “Específico de cepa” se usa en el presente documento en el contexto de una respuesta inmune que se dirige a, o al menos se dirige predominantemente a, una cepa autóloga de *N. meningitidis*.

Como se usa en el presente documento, “reactividad cruzada” significa una capacidad de un polipéptido de la invención de provocar una respuesta inmune dirigida a una o más cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

45 Como se usa en el presente documento, “protección cruzada” significa una capacidad de un polipéptido de la invención de provocar una respuesta inmune y mediante ella proporcionar protección contra la infección por una o más cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

50 Por tanto, a la luz de lo anterior, dicho polipéptido de la invención se puede denominar en el presente documento como un “inmunógeno” o como que es “inmunogénico”.

Se pueden ejemplificar proteínas NhhA modificadas adicionales mediante las secuencias de aminoácidos mostradas en las figuras 6 a 9 (SEQ ID NO: 24-27) y la figura 14. También se contemplan fragmentos, derivados y variantes (tales como variantes alélicas) de estas proteína ejemplificadas.

55 Por ejemplo, se pueden delecionar aminoácidos de cualquiera de las secuencias C1-5 mostradas en la figura 1, mientras que no se necesita delecionar todos los aminoácidos no conservados en las regiones V1-4 para reducir la inmunogenicidad específica de cepa.

60 Por tanto, las proteínas aisladas anteriores pueden incluir fragmentos de las regiones C1-5 y V1-4.

En efecto, como se describirá posteriormente en el presente documento en los ejemplos, puede ser ventajoso para los fines de la producción basada en ADN recombinante de los polipéptidos anteriores, delecionar uno o unos pocos aminoácidos de una región C1, C2, C3, C4 y/o C5 o una región V1, V2, V3 y/o V4 en el interés de utilizar sitios de endonucleasas de restricción convenientes y lograr un alto nivel de expresión de proteínas inmunogénicas estables.

Un “*fragmento*” incluye una secuencia de aminoácidos que constituye menos del 100%, pero al menos el 20%, preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 80% o incluso más preferiblemente al menos el 90% de dichas regiones C1, C2, C3, C4 o C5.

5 Los fragmentos, por ejemplo, pueden ser péptidos que comprenden tan poco como doce aminoácidos tal como la región C2 (SEQ ID NO: 11) o secuencias de al menos veinte aminoácidos contiguos, o más de cien aminoácidos contiguos que corresponden a parte o todo de la regiones C1, C2, C3, C4 y/o C5 descritas en el presente documento.

10 Otros fragmentos ejemplificados en el presente documento son polipéptidos NhhA modificados que han experimentado procesamiento postraduccional para formar un polipéptido maduro, tal como se muestra en la figura 14.

15 En otra forma de realización, un “*fragmento*” es un péptido pequeño, por ejemplo, de al menos 6, preferiblemente al menos 10 y más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud, que comprende uno o más determinantes antigénicos o epítomos derivados de proteínas NhhA modificadas. También se contemplan fragmentos más largos que comprenden más de un péptido, y se pueden obtener mediante la aplicación de técnicas de ácido nucleico recombinante estándar o sintetizar usando técnicas de síntesis en fase líquida o sólida convencionales. Por ejemplo, se puede hacer referencia a síntesis en solución o síntesis en fase sólida como se describe, por ejemplo, en el
20 capítulo 9 titulado “*Peptide Synthesis*” por Atherton y Shephard que se incluye en una publicación titulada “*Synthetic Vaccines*” editada por Nicholson y publicada por Blackwell Scientific Publications. De forma alternativa, se pueden producir péptidos mediante digestión de un polipéptido de la invención con proteinasas tales como endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C y estafilococinas proteasa V8. Los fragmentos digeridos se pueden purificar mediante, por ejemplo, técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

25 Como se usa en el presente documento, polipéptidos “*variantes*” son polipéptidos en los que uno o más aminoácidos se han sustituido por aminoácidos diferentes. Se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos se pueden cambiar a otros con propiedades en general similares sin cambiar la naturaleza de la actividad del polipéptido (sustituciones conservadoras). Las sustituciones conservadoras ejemplares en los polipéptidos se pueden hacer según la tabla 2.

30 Se pueden hacer cambios sustanciales en la función seleccionando sustituciones que son menos conservadoras que las mostradas en la tabla 2. Otros cambios serían sustituciones no conservadoras y se pueden tolerar relativamente menos de estas. En general, las sustituciones que probablemente produzcan los cambios mayores en las propiedades de un polipéptido son esas en que (a) un residuo hidrofílico (por ejemplo, Ser o Thr) se sustituye por, o mediante, un residuo hidrofóbico (por ejemplo, Ala, Leu, Ile, Phe o Val); (b) una cisteína o prolina se sustituye por, o mediante, cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) se sustituye por, o mediante, un residuo electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp) o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa (por ejemplo, Phe o Trp) se sustituye por, o mediante, uno que tiene una
35 cadena lateral más pequeña (por ejemplo, Ala o Ser) o sin cadena lateral (por ejemplo, Gly).

El término “*variante*” también incluye polipéptidos NhhA producidos de variantes alélicas de las secuencias ejemplificadas en esta especificación.

45 Las variantes del polipéptido NhhA pueden estar dentro del ámbito del término “*homólogos polipeptídicos*”.

Los homólogos polipeptídicos comparten al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80% y más preferiblemente al menos el 90% de identidad de secuencia.

50 Como en general se usa en el presente documento, un “*homólogo*” comparte una relación de secuencia de nucleótidos o aminoácidos definible con un ácido nucleico o polipéptido de la invención según pueda ser el caso.

Por ejemplo, se contempla que tales homólogos tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de las ejemplificadas en el presente documento, pero que son inmunogénicas y proporcionan inmunidad con protección
55 cruzada.

Específicamente excluidos del ámbito del término “*homólogos*” están los polipéptidos NhhA y ácidos nucleicos *nhhA* salvajes.

60 Incluidos en el ámbito de los homólogos están los “*ortólogos*”, que son polipéptidos funcionalmente relacionados y sus ácidos nucleicos codificantes, aislados de especies bacterianas diferentes de *N. meningitidis*.

Los términos usados en el presente documento para describir las relaciones de secuencia entre ácidos nucleicos y polipéptidos respectivos incluyen “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” e “identidad sustancial”. Puesto que los respectivos ácidos nucleicos/polipéptidos pueden comprender cada uno (1) solo una o más partes de una secuencia de ácido nucleico/polipéptido completa que están compartidos

por los ácidos nucleicos/polipéptidos, y (2) una o más partes que son divergentes entre los ácidos nucleicos/polipéptidos, las comparaciones de secuencias típicamente se realizan comparando las secuencias en una “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una “ventana de comparación” se refiere a un segmento conceptual de típicamente 12 residuos contiguos que se compara a una secuencia de referencia. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20% o menos comparada con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las secuencias respectivas. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (programa Geneworks por Intelligenetics; GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA, en el paquete de software genético de Wisconsin versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE UU) o mediante inspección y el mejor alineamiento (es decir, el que produce el porcentaje de homología más alto en la ventana de comparación) generado por cualquiera de los varios métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como, por ejemplo, divulgaron Altschul *et al.*, 1997, Nucl. Acids Res. **25** 3389.

Se puede encontrar una discusión detallada del análisis de secuencias en la unidad 19.3 de CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.* (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999).

El término “*identidad de secuencia*” se usa en el presente documento en su sentido más amplio para incluir el número de coincidencias de nucleótidos o aminoácidos exactos teniendo en cuenta un alineamiento apropiado que usa un algoritmo estándar, teniendo en cuenta el nivel al que las secuencias son idénticas en una ventana de comparación. Por tanto, un “*porcentaje de identidad de secuencia*” se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se produce las bases del ácido nucleico idénticas (por ejemplo, A, T, C, G, I) en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Por ejemplo, se puede entender que “*identidad de secuencia*” signifique el “*porcentaje de coincidencia*” calculado por el programa informático DNASIS (versión 2.5 para Windows; disponible de Hitachi Software engineering Co., Ltd., San Francisco Sur, California, EE UU).

Por tanto, está dentro de las capacidades del experto en la materia preparar homólogos polipeptídicos, tales como variantes como se han definido en el presente documento anteriormente, por tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, se pueden mutar ácidos nucleicos usando mutagénesis al azar, por ejemplo, usando mutagénesis con transposones, o mutagénesis dirigida. Los fragmentos de ADN resultantes se clonan después en huéspedes de expresión adecuados tal como *E. coli* usando tecnología convencional y se detectan los clones que mantienen la actividad deseada. Donde se han derivado los clones usando técnicas de mutagénesis al azar, los clones positivos se tendrían que secuenciar para detectar la mutación.

Como se usa en el presente documento, polipéptidos “*derivados*” son polipéptidos que se han alterado, por ejemplo, por conjugación o formación de complejos con otros grupos químicos o por técnicas de modificación postraduccionales como se entendería en la técnica. Tales derivados incluyen deleciones y/o adiciones de aminoácidos a polipéptidos NhhA o variantes de los mismos, en donde dichos derivados provocan una respuesta inmune.

Las “*adiciones*” de aminoácidos pueden incluir la fusión de los polipéptidos de la invención con otros polipéptidos o proteínas. A este respecto, se apreciará que los polipéptidos de la invención se pueden incorporar en polipéptidos mayores, y también se puede esperar que tales polipéptidos mayores sean inmunogénicos. Los polipéptidos como se ha descrito anteriormente se pueden fusionar con una proteína adicional, por ejemplo, que no deriva de *N. meningitidis*. La otra proteína puede, a modo de ejemplo, ayudar en la purificación de la proteína. Por ejemplo, se puede usar una etiqueta de polihistidina o una proteína de unión a maltosa. De forma alternativa, puede producir una respuesta inmune que sea eficaz contra *N. meningitidis* o puede producir una respuesta inmune contra otro patógeno. Otras posibles proteínas de fusión son las que producen una respuesta inmunomoduladora. Los ejemplos particulares de tales proteínas incluyen proteína A o glutatión S-transferasa (GST). Además, el polipéptido se puede fusionar a un componente de vacuna basado en oligosacáridos donde actúa como una proteína soporte.

Otros derivados incluyen, pero no están limitados a, modificación en las cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de péptidos, polipéptidos o proteínas y el uso de entrecruzadores y otros métodos que imponen restricciones conformacionales en los polipéptidos, fragmentos y variantes de la invención. Los ejemplos de modificaciones en las cadenas laterales contemplados por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tal como mediante acilación con anhídrido acético; acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; amidinación con metilacetimidato; carbamoilación de grupos amino con cianato; piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido por reducción con NaBH₄; alquilación reductora mediante reacción con un aldehído seguido por reducción con NaBH₄; y trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS).

El grupo carboxilo se puede modificar por activación de carbodiimida a través de la formación de O-acilisourea seguido por la posterior derivación, a modo de ejemplo, a una amida correspondiente.

El grupo guanidina de los residuos de arginina se puede modificar por la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilglioxal y glioxal.

5 Los grupos sulfhidrido se pueden modificar por métodos tales como oxidación con ácido perbórmico a ácido cisteico; formación de derivados mercuriales usando ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, 4-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4-nitrofenol, cloruro de fenilmercurio y otros mercuriales; formación de disulfuros mezcla con otros compuestos tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; y carbamoilación con cianato a pH alcalino.

10 Los residuos de triptófano se pueden modificar, por ejemplo, por alquilación del anillo indol con bromuro de 2-hidroxí-5-nitrobenzilo o haluros de sulfonilo o por oxidación con N-bromosuccinimida.

Los residuos de tirosina se pueden modificar por nitración con tetranitrometano para formar un derivado 3-nitrotirosina.

15 El anillo de imidazol de un residuo de histidina se puede modificar por N-carboxilación con dietilpirocarbonato o por alquilación con derivados del ácido yodoacético.

20 Los ejemplos de incorporación de aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis de péptidos incluyen pero no están limitados a, el uso de ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, t-butilglicina, norleucina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, 2-tienilalanina y/o isómeros D de aminoácidos.

25 La invención también contempla modificar covalentemente un polipéptido de la invención con dinitrofenol, para hacerlo inmunogénico en seres humanos.

Las proteínas aisladas de la invención se pueden preparar por cualquier procedimiento adecuado que conocen los expertos en la materia.

30 Por ejemplo, la proteína se puede preparar como un polipéptido recombinante por un procedimiento que incluye los pasos de:

- (i) preparar una construcción de expresión que comprende un ácido nucleico *nhhA* modificado de la invención, operativamente unido a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras;
- 35 (ii) transfectar o transformar una célula huésped adecuada con la construcción de expresión; y
- (iii) expresar el polipéptido recombinante en dicha célula huésped.

Se proporcionarán un número de ejemplos en el presente documento posteriormente que describen la producción de ácidos nucleicos *nhhA* modificados de la invención por PCR.

40 En una forma de realización particular, la PCR es PCR de solapamiento de ajuste, como se describirá en el presente documento posteriormente, método que se basa en el descrito en Ho *et al*, 1989, Gene **77** 51, y por Horton *et al.*, 1989, Gene **77** 61.

45 Para los fines de expresión en células huésped, el ácido nucleico recombinante está operativamente unido a una o más secuencias reguladoras en un vector de expresión.

Un “vector de expresión” puede ser un vector extracromosómico autorreplicante tal como un plásmido, o un vector que se integra en un genoma huésped.

50 Mediante “operativamente unido” se quiere decir que dicha(s) secuencia(s) de nucleótidos reguladora(s) se coloca(n) relativa(s) al ácido nucleico recombinante de la invención para iniciar, regular o controlar de otra manera la transcripción.

55 Las secuencias nucleotídicas reguladoras en general serán apropiadas para la célula huésped usada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped.

60 Típicamente, dicha una o más secuencias nucleotídicas reguladoras pueden incluir, pero no están limitadas a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras.

La invención contempla promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor.

En una forma de realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador de selección para permitir la selección de células huéspedes transformadas. Los genes marcadores de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

5 En una forma de realización, el vector de expresión es pCO14K, que tiene un promotor *porA* y un gen de selección de kanamicina, como se describirá en detalle posteriormente en el presente documento. Según esta forma de realización, la célula huésped es una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *E. coli* y *N. meningitidis*.

10 El vector de expresión también puede incluir un compañero de fusión (típicamente proporcionado por el vector de expresión) de modo que el polipéptido recombinante de la invención se exprese como un polipéptido de fusión con dicho compañero de fusión. La ventaja principal de los compañeros de fusión es que ayudan a la identificación y/o purificación de dicho polipéptido de fusión.

15 Para expresar dicho polipéptido de fusión, es necesario ligar una secuencia de nucleótidos según la invención en el vector de expresión de modo que los marcos de lectura de traducción del compañero de fusión y la secuencia de nucleótidos de la invención coincidan.

20 Ejemplos bien conocidos de compañeros de fusión incluyen, pero no están limitados a, glutatión-S-transferasa (GST), parte Fc de IgG humana, proteína de unión a maltosa (MBP) y hexahistidina (HIS₆), que son particularmente útiles para el aislamiento del polipéptido de fusión por cromatografía de afinidad. Para los fines de purificación del polipéptido de fusión por cromatografía de afinidad, las matrices relevantes para cromatografía de afinidad son resinas conjugadas a glutatión, amilosa y níquel o cobalto, respectivamente. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con compañeros de fusión de (HIS₆) y el sistema de purificación de GST de Pharmacia.

25 Un compañero de fusión preferido es MBP, que se describe posteriormente en el presente documento en el ejemplo 11.

30 Otro compañero de fusión bien conocido en la técnica es la proteína fluorescente verde (GFP). Este compañero de fusión sirve como una "etiqueta" fluorescente que permite que el polipéptido de fusión de la invención se identifique por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo. La etiqueta GFP es útil cuando se evalúa la localización subcelular del polipéptido de fusión de la invención, o para aislar células que expresan el polipéptido de fusión de la invención. Los métodos de citometría de flujo tales como la separación celular activada por fluorescencia (FACS) son particularmente útiles en esta última aplicación.

35 Preferiblemente, los compañeros de fusión también tienen sitios de corte de proteasas, tal como para el factor X_a o trombina, lo que permite a la proteasa relevante digerir parcialmente el polipéptido de fusión de la invención y por tanto liberar el polipéptido recombinante de la invención del mismo. El polipéptido liberado se puede aislar después del compañero de fusión por separación cromatográfica subsecuente.

40 Compañeros de fusión según la invención también incluyen en su ámbito "etiquetas epítopos", que habitualmente son secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Los ejemplos bien conocidos de etiquetas epítopos para las que están disponibles fácilmente anticuerpos monoclonales específicos incluyen etiquetas c-myc, hemaglutinina del virus de la gripe y FLAG.

45 Como anteriormente en el presente documento, los polipéptidos de la invención se pueden producir cultivando una célula huésped transformada con dicha construcción de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Las condiciones apropiadas para la expresión de la proteína variarán con la elección del vector de expresión y la célula huésped. Esto lo determina fácilmente el experto en la materia mediante experimentación rutinaria.

50 Las células huésped adecuadas para la expresión pueden ser procariotas o eucariotas. Una célula huésped preferida para la expresión de un polipéptido según la invención es una bacteria. La bacteria usada puede ser *Escherichia coli* o *N. meningitidis*.

55 En una forma de realización preferida, la célula huésped es *N. meningitidis* que se ha modificado de modo que no exprese PorA, Opa, Opc o polisacárido capsular y exprese un fenotipo de lipopolisacárido deseado.

60 De forma alternativa, la célula huésped puede ser una célula de insecto tal como, por ejemplo, células SF9 que se pueden utilizar con un sistema de expresión de baculovirus.

65 La proteína recombinante la puede preparar convenientemente el experto en la materia usando protocolos estándar como por ejemplo se describen en Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), en particular las secciones 16 y 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), en particular los capítulos 10 y 16; y CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999) en particular los capítulos 1, 5 y 6.

Los métodos preferidos de expresión de las proteínas NhhA modificadas recombinantes de la invención, y los métodos para detectar la proteína expresada, se proporcionan posteriormente en el presente documento en los ejemplos.

5 **Secuencias de nucleótidos**

La invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína NhhA modificada de la invención.

10 También se describen ácidos nucleicos aislados que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica una o más regiones constantes (C) del polipéptido NhhA como se describe en las figuras 1 y 2. Estos ácidos nucleicos aislados pueden codificar además uno o más aminoácidos no conservados (región V) tal como también se identifican en las figuras 1 y 2.

15 Los ácidos nucleicos aislados particulares se proporcionan en SEQ ID NO: 28-32 y las figuras 5-9.

El término “ácido nucleico” como se usa en el presente documento designa ARNm, ARN, ARNc y ADN mono- o bicatenario, dicho ADN incluye ADNc y ADN genómico.

20 Un “polinucleótido” es un ácido nucleico que tiene ochenta (80) o más nucleótidos contiguos, mientras que un “oligonucleótido” tiene menos de ochenta (80) nucleótidos contiguos.

Una “sonda” puede ser un oligonucleótido o polinucleótido mono o bicatenario, adecuadamente marcado para el fin de detectar secuencias complementarias en transferencia de tipo Northern o Southern, por ejemplo.

25 Un “cebador” habitualmente es un oligonucleótido monocatenario, preferiblemente que tiene de 15-50 nucleótidos contiguos, que es capaz de hibridar con un ácido nucleico complementario “molde” y ser extendido de una manera dependiente del molde por la acción de una ADN polimerasa tal como Taq polimerasa, ADN polimerasa dependiente de ARN o Sequenase™.

30 También se describen homólogos de ácidos nucleicos de la invención como se han definido anteriormente en el presente documento.

Tales homólogos de ácidos nucleicos excluyen los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos NhhA salvajes de longitud completa.

35 Por ejemplo, los homólogos de ácidos nucleicos codifican péptidos y polipéptidos, estructuralmente relacionados a las regiones V y C de NhhA de la invención, que pueden ser útiles para los fines de proporcionar inmunidad protectora cruzada a *N. meningitidis* mediante inmunización.

40 Los homólogos de ácidos nucleicos comparten al menos el 60%, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80% e incluso más preferiblemente al menos el 90% de identidad de secuencia.

45 Los homólogos de ácidos nucleicos pueden hibridar con ácidos nucleicos de la invención en condiciones al menos de restricción baja, preferiblemente en condiciones al menos de restricción media y más preferiblemente en condiciones de restricción alta.

50 “Hibridar e hibridación” se usa en el presente documento para indicar el apareamiento de secuencias de nucleótidos al menos parcialmente complementarias para producir híbridos ADN-ADN, ARN-ARN o ADN-ARN. Las secuencias híbridas que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias se producen a través del apareamiento de bases entre purinas y pirimidinas complementarias como se sabe bien en la técnica.

A este respecto, se apreciará que las purinas modificadas (por ejemplo, inosina, metilinosina y metiladenosina) y las pirimidinas modificadas (tiouridina y metilcitosina) también se pueden comprometer en el apareamiento de bases.

55 “Restricción” como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de temperatura y fuerza iónica, y presencia o ausencia de ciertos solventes orgánicos y/o detergentes durante la hibridación. Cuanto mayor sea la restricción, mayor será el nivel requerido de complementariedad entre secuencias de nucleótidos que hibridan.

60 “Condiciones rigurosas” designa esas condiciones en las que solo hibridará un ácido nucleico que tiene una alta frecuencia de bases complementarias.

La referencia en el presente documento a condiciones de baja restricción incluye y abarca:

65 (i) desde al menos aproximadamente el 1% v/v hasta al menos aproximadamente el 15% v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M de sal para la hibridación a 42°C, y al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M de sal para lavar a 42°C; y

- (ii) seroalbúmina bovina (BSA) al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para la hibridación a 65°C; y (i) 2xSSC, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavar a temperatura ambiente.

5 Las condiciones de restricción media incluyen y abarcan:

- (i) desde al menos aproximadamente el 16% v/v hasta al menos aproximadamente el 30% v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M de sal para la hibridación a 42°C, y al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M de sal para lavar a 42°C; y
- (ii) seroalbúmina bovina (BSA) al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para la hibridación a 65°C; y (a) 2xSSC, SDS al 0,1%; o (b) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavar a 42°C.

15 Las condiciones de restricción alta incluyen y abarcan:

- (i) desde al menos aproximadamente el 31% v/v hasta al menos aproximadamente el 50% v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M de sal para la hibridación a 42°C, y al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M de sal para lavar a 42°C;
- (ii) BSA al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para la hibridación a 65°C; y (a) 0,1 x SSC, SDS al 0,1%; o (b) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavar a temperatura ambiente en exceso de 65°C durante aproximadamente una hora; y
- (iii) 0,2 x SSC, SDS al 0,1% para lavar a o por encima de 68°C durante aproximadamente 20 minutos.

25 En general, los lavados se llevan a cabo a una $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C) \% - 12^\circ\text{C}$. En general, la T_m de un ADN dúplex desciende en aproximadamente 1°C con cada aumento del 1% en el número de bases mal apareadas.

30 No obstante lo anterior, las condiciones rigurosas se conocen bien en la técnica, tal como se describe en los capítulos 2.9 y 2.10 de Ausubel *et al.*, anteriormente. El experto en la materia también reconocerá que se pueden manipular varios factores para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la restricción de los lavados finales puede servir para asegurar un alto grado de hibridación.

35 Típicamente, las secuencias de nucleótidos complementarias se identifican por técnicas de transferencia que incluyen un paso por el cual los nucleótidos se inmovilizan en una matriz (preferiblemente una membrana sintética tal como nitrocelulosa), un paso de hibridación y un paso de detección. Se usa transferencia de tipo Southern para identificar una secuencia de ADN complementaria; se usa transferencia de tipo northern para identificar una secuencia de ARN complementaria. Se pueden usar transferencia en manchas o transferencia en ranuras para identificar secuencias polinucleotídicas complementarias ADN/ADN, ADN/ARN o ARN/ARN. Tales técnicas las conocen bien los expertos en la materia, y se han descrito en Ausubel *et al.*, anteriormente, en las páginas 2.9.1 a 2.9.20. Según tales métodos, la transferencia Southern implica separar moléculas de ADN según el tamaño mediante electroforesis en gel, transferir el ADN separado por tamaño a una membrana sintética e hibridar el ADN unido a la membrana con una secuencia de nucleótidos complementaria.

45 En la transferencia en mancha y la transferencia en ranura, las muestras de ADN se aplican directamente a una membrana sintética antes de la hibridación como anteriormente.

50 Se usa un paso de transferencia alternativo cuando se identifican ácidos nucleicos complementarios en una genoteca de ADNc o ADN genómico, tal como mediante el proceso de hibridación en placa o colonia. Otros ejemplos típicos de este procedimiento se describen en los capítulos 8-12 de Sambrook *et al.*, anteriormente.

55 Típicamente, se puede usar el siguiente procedimiento general para determinar las condiciones de hibridación. Los ácidos nucleicos se transfieren a una membrana sintética, como se ha descrito anteriormente. Se marca una secuencia de nucleótidos salvaje de la invención como se ha descrito anteriormente, y se analiza la capacidad de este ácido nucleico marcado para hibridar con una secuencia de nucleótidos inmovilizada.

60 El experto en la materia reconocerá que un número de factores influyen en la hibridación. La actividad específica de la secuencia polinucleotídica radioactivamente marcada típicamente debe ser mayor de o igual a aproximadamente 10⁸ dpm/μg para proporcionar una señal detectable. Una secuencia de nucleótidos radiomarcada de actividad específica 10⁸ a 10⁹ dpm/μg puede detectar aproximadamente 0,5 pg de ADN. Se sabe bien en la técnica que se debe inmovilizar suficiente ADN en la membrana para permitir la detección. Es deseable tener un exceso de ADN inmovilizado, habitualmente de 1-10 μg. Añadir un polímero inerte tal como sulfato de dextrano (MW 500.000) al 10% (p/v) o polietilenglicol 6000 durante la hibridación también puede aumentar la sensibilidad de la hibridación (véase Ausubel *et al.*, anteriormente en 2.10.10).

Para alcanzar resultados significativos de la hibridación entre un ácido nucleico inmovilizado en una membrana y un ácido nucleico marcado, una cantidad suficiente del ácido nucleico marcado debe hibridar con el ácido nucleico inmovilizado después de lavar. El lavado asegura que el ácido nucleico marcado hibrida solo con el ácido nucleico inmovilizado con un grado deseado de complementariedad con el ácido nucleico marcado.

5 Los métodos para detectar ácidos nucleicos marcados hibridados con un ácido nucleico inmovilizado los conocen bien los expertos en la materia. Tales métodos incluyen autorradiografía, detección quimioluminiscente, fluorescente y colorimétrica.

10 En otra forma de realización, los homólogos de ácidos nucleicos se pueden preparar según el siguiente procedimiento:

- (i) obtener un extracto de ácido nucleico de un huésped adecuado;
- (ii) crear cebadores que estén opcionalmente degenerados en donde cada uno comprende una parte de una
- 15 secuencia de nucleótidos de la invención; y
- (iii) usar dichos cebadores para amplificar, a través de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, uno o más productos de amplificación a partir de dicho extracto de ácido nucleico.

Adecuadamente, el huésped es una bacteria.

20 Preferiblemente, el huésped es del género *Neisseria*.

Más preferiblemente, el huésped es *N. meningitidis* o *N. lactamica*.

25 Los cebadores útiles según los métodos de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos incluyen SEQ ID NO: 40-51 como se describe en detalle posteriormente en el presente documento.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos adecuadas las conocen bien los expertos en la materia, e incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como, por ejemplo, se describe en el capítulo 15 de Ausubel *et al.*, anteriormente; amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) como, por ejemplo, se describe en la patente en EE UU No. 5.422.252; replicación de círculo rodante (RCR) como, por ejemplo, se describe en Liu *et al.*, 1996, J. Am. Chem. Soc. **118** 1587 y la solicitud internacional WO 92/01813 y Lizardi *et al.*, (Solicitud Internacional WO 97/19193); amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) como por ejemplo, describen Sooknanan *et al.*, 1994, Biotechniques **17** 1077); y amplificación por replicasa Q-β como, por ejemplo, describen Tyagi *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** 5395.

Como se usa en el presente documento, un "producto de amplificación" se refiere a un producto de ácido nucleico generado por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

40 **Anticuerpos**

También se describen anticuerpos contra los fragmentos, variantes y derivados de proteínas aisladas descritos en el presente documento. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se pueden encontrar protocolos bien conocidos aplicables a la producción, purificación y uso de anticuerpos, por ejemplo, en el capítulo 2 de Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1991-1994) y Harlow, E. & Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

En general, tales anticuerpos se unen a o conjugan con un polipéptido, fragmento, variante o derivado como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Tales anticuerpos se pueden preparar, por ejemplo, inyectando un polipéptido, fragmento, variante o derivado como se describe en el presente documento en una especie de producción, que puede incluir ratones o conejos, para obtener antisueros policlonales. Los expertos en la materia conocen bien los métodos de producir anticuerpos policlonales. Los protocolos ejemplares que se pueden usar se describen, por ejemplo en Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, anteriormente, y en Harlow, E. & Lane, D., 1988, anteriormente.

En lugar de los antisueros policlonales obtenidos en la especie de producción, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando el método estándar como, por ejemplo, describen en un artículo Köhler & Milstein, 1975, Nature **256**, 495 o por modificaciones más recientes del mismo como, por ejemplo, se describen en Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, anteriormente, mediante inmortalización de células de bazo u otras productoras de anticuerpos derivadas de una especie de producción que se ha inoculado con uno o más de los polipéptidos, fragmentos, variantes o derivados de la invención.

También se describen anticuerpos que comprenden fragmentos Fc o Fab de los anticuerpos policlonales o monoclonales a los que se hace referencia anteriormente. De forma alternativa, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos Fv de cadena única (scFv) contra los péptidos descritos en el presente documento. Tales scFv se

pueden preparar, por ejemplo, según los métodos descritos respectivamente en la patente en EE UU No. 5.091.513, la patente europea No. 239.400 o el artículo de Winter & Milstein, 1991, Nature **349** 293.

5 Tales anticuerpos se pueden usar para cromatografía de afinidad en el aislamiento de polipéptidos de *N. meningitidis* naturales o recombinantes. Por ejemplo, se puede hacer referencia a los procedimientos cromatográficos de inmunoafinidad descritos en el capítulo 9.5 de Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, anteriormente.

10 Los anticuerpos se pueden usar para:

- (i) cribar librerías de expresión para identificar polipéptidos variantes de la invención;
- (ii) identificar fragmentos inmunorreactivos o epítomos inmunorreactivos; y/o
- (iii) detectar infección por *N. meningitidis*.

15 como se describirá en el presente documento posteriormente pero sin limitación a esos usos particulares.

Detección de *N. meningitidis*

20 La presencia o ausencia de *N. meningitidis* en un individuo se puede determinar aislando una muestra biológica de dicho individuo, mezclando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito anteriormente con la muestra biológica, y detectando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo específicamente unido lo que indica la presencia de *N. meningitidis* en la muestra.

25 El término "*muestra biológica*" como se usa en el presente documento se refiere a una muestra que se puede extraer, sin tratar, tratada, diluida o concentrada de un individuo, tal como un paciente. Adecuadamente, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, saliva, orina, sudor, líquido ascítico, líquido peritoneal, líquido sinovial, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, biopsia de piel, y similares.

30 Se puede usar cualquier técnica adecuada para determinar la formación del complejo. Por ejemplo, se puede utilizar en inmunoensayos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la invención que tenga un marcador asociado con el mismo. Tales inmunoensayos pueden incluir, pero no están limitados a, radioinmunoensayos (RIA), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) y técnicas inmunocromatográficas (TIC) que conocen bien los expertos en la materia.

35 Por ejemplo, se puede hacer referencia al capítulo 7 de Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, anteriormente, que divulga una variedad de inmunoensayos que se pueden usar según la presente invención. Los inmunoensayos pueden incluir ensayos competitivos como se entiende en la técnica.

40 El marcador asociado con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede incluir los siguientes:

- (A) unión directa del marcador al anticuerpo o fragmento de anticuerpo;
- (B) unión indirecta del marcador al anticuerpo o fragmento de anticuerpo, es decir, unión del marcador a otro reactivo del ensayo que posteriormente se une al anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y
- (C) unión de un producto de reacción posterior del anticuerpo o fragmento de anticuerpo:

45 El marcador se puede seleccionar de un grupo que incluye un cromógeno, un catalizador, una enzima, un fluoróforo, una molécula quimioluminiscente, un ión lantánido tal como europio (Eu³⁴), un radioisótopo y un marcador visual directo. En el caso de un marcador visual directo, se puede hacer uso de una partícula coloidal metálica o no metálica, una partícula de colorante, una enzima o un sustrato, un polímero orgánico, una partícula de látex, un liposoma, u otra vesícula que contiene una sustancia que produce una señal y similares.

50 Se divulgan un gran número de enzimas útiles como marcadores en las especificaciones de patente en los Estados Unidos U.S. 4.366.241, U.S. 4.843.000 y U.S. 4.849.338. Los marcadores enzimáticos útiles en la presente invención incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, luciferasa β -galactosidasa, glucosa oxidasa, lisozima, malato deshidrogenasa, y similares. El marcador enzimático se puede usar solo o en combinación con una segunda enzima en solución

Adecuadamente, el fluoróforo se selecciona de un grupo que incluye isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITL) o R-ficoeritrina (RPE).

60 La invención también se extiende a un método para detectar la infección de pacientes por *N. meningitidis*, dicho método comprende los pasos de poner en contacto una muestra biológica de un paciente con un polipéptido de la invención, y determinar la presencia o ausencia de un complejo entre dicho polipéptido y anticuerpos específicos de *N. meningitidis* en dicho suero, en donde la presencia de dicho complejo es indicativa de dicha infección.

En una forma de realización preferida, la detección del complejo anterior se efectúa modificando detectablemente dicho polipéptido con un marcador adecuado como se sabe bien en la técnica y usando tal compuesto modificado en un inmunoensayo como, por ejemplo, se describe anteriormente.

5 También se describe un método para detectar bacterias *N. meningitidis* en una muestra biológica que se sospecha contiene dichas bacterias, dicho método comprende los pasos de aislar la muestra biológica de un paciente, detectar una secuencia de ácido nucleico según la invención en dicha muestra que indica la presencia de dichas bacterias. La detección de dicha secuencia de ácido nucleico se puede determinar usando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, se puede usar un ácido nucleico marcado según la invención como una sonda en una transferencia Southern de un extracto de ácido nucleico obtenido de un paciente como se sabe bien en la técnica.

De forma alternativa, se puede utilizar un ácido nucleico marcado según la invención como una sonda en una transferencia Northern de un extracto de ARN del paciente.

15 Preferiblemente, se utiliza un extracto de ácido nucleico del paciente junto con cebadores oligonucleotídicos correspondientes a las secuencias sentido y antisentido de una secuencia de ácido nucleico según la invención, o secuencias flanqueantes de la misma, en una reacción de amplificación de ácido nucleico tal como PCR, o la reacción en cadena de la ligasa (LCR) como, por ejemplo, se describe en la solicitud internacional WO89/09385.

20 También son apropiadas una variedad de técnicas de detección de fase sólida automatizadas. Por ejemplo, se usan matrices de cebadores inmovilizados a escala muy grande (VLSIPS™) para la detección de ácidos nucleicos como, por ejemplo, describen Fodor *et al.*, 1991, *Science* **251** 767 y Kazal *et al.*, 1996, *Nature Medicine* **2** 753. Los expertos en la materia conocen bien las técnicas genéricas anteriores.

25 **Composiciones farmacéuticas**

Una característica adicional de la invención es el uso del polipéptido de la invención ("*agentes inmunogénicos*") como activos en una composición farmacéutica para proteger pacientes contra la infección por *N. meningitidis*.

30 Adecuadamente, la composición farmacéutica comprende un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Mediante "*soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable*" se quiere decir un relleno, diluyente o sustancia encapsulante sólida o líquida que se puede usar de forma segura en la administración sistémica. Dependiendo de la vía particular de administración, se pueden usar una variedad de soportes bien conocidos en la técnica. Estos soportes se pueden seleccionar de un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido algínico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica y sales tales como sales de ácidos minerales incluyendo clorhidratos, bromuros y sulfatos, ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos y malonatos y agua sin pirógenos.

Una referencia útil que describe los soportes, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. EE UU, 1991).

45 Se puede emplear cualquier vía de administración segura para suministrar a un paciente la composición de la invención. Por ejemplo, se puede emplear oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa, intraarticular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, inhalación, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica y similares. La inyección intramuscular y subcutánea es apropiada, por ejemplo para la administración de composiciones inmunogénicas, vacunas y vacunas de ADN.

50 Las formas farmacéuticas incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, pastillas, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas farmacéuticas también pueden incluir inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este fin u otras formas de implantes modificados para actuar además de esta manera. La liberación controlada del agente terapéutico se puede realizar recubriendo el mismo, por ejemplo, con polímeros hidrofóbicos incluyendo resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y poliglicólico, y ciertos derivados de celulosa tal como hidroxipropilmetilcelulosa. Además, la liberación controlada se puede realizar usando otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración oral o parenteral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, saquitos o comprimidos que contiene cada uno una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos de la invención, como un polvo o gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Tales composiciones se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia pero todos los métodos incluyen el paso de asociar uno o más agentes inmunógenos como se ha descrito anteriormente con el soporte que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se

preparan mezclando uniformemente y a fondo los agentes inmunogénicos de la invención con los soportes líquidos o soportes sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en la presentación deseada.

5 Las composiciones anteriores se pueden administrar de una manera compatible con la formulación farmacéutica, y en tal cantidad que sea inmunogénicamente eficaz para proteger pacientes de la infección por *N. meningitidis*. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en un paciente durante el tiempo tal como una reducción en el nivel de *N. meningitidis*, o para inhibir la infección por *N. meningitidis*. La cantidad del/de los agente(s) inmunogénico(s) que se va a administrar
10 puede depender del sujeto que se va a tratar incluido la edad, sexo, peso y estado general de salud del mismo. A este respecto, las cantidades precisas del/de los agente(s) inmunogénico(s) requeridas para administrarse dependerán del juicio del médico.

15 Al determinar la cantidad eficaz del agente inmunogénico que se va a administrar en el tratamiento o profilaxis contra *N. meningitidis*, el médico puede evaluar los niveles circulantes en plasma, la progresión de la enfermedad y la producción de anticuerpo anti-*N. meningitidis*. En cualquier caso, las dosis adecuadas de los agentes inmunogénicos de la invención las pueden determinar fácilmente los expertos en la materia. Tales dosis pueden estar en el orden de nanogramos a miligramos de los agentes inmunogénicos de la invención.

20 Las composiciones anteriores se pueden usar como vacunas terapéuticas o profilácticas. Según esto, la invención se extiende a la producción de vacunas que contienen como activos uno o más agentes inmunogénicos de la invención. Se contemplan una variedad de procedimientos aplicables para producir tales vacunas. Los procedimientos ejemplares incluyen, por ejemplo, los descritos en NEW GENERATION VACCINES (1997, Levine *et al.*, Marcel Dekker, Inc. Nueva York, Basilea Hong Kong).

25 Un agente inmunogénico según la invención se puede mezclar, conjugar o fusionar con otros antígenos, incluyendo epítopos de células B o T de otros antígenos. Además, se puede conjugar a un soporte como se describe posteriormente.

30 Cuando se usa un péptido hapténico de la invención (es decir, un péptido que reacciona con los anticuerpos afines, pero que no puede por sí mismo provocar una respuesta inmune), se puede conjugar con un soporte inmunogénico. Los soportes útiles se conocen bien en la técnica e incluyen por ejemplo: tiroglobulina; albúminas tal como seroalbúmina humana, toxinas, toxoides o cualquier material con reactividad cruzada mutante (CRM) de la toxina del tétano, difteria, pertúsica, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*; poliaminoácidos tal como poli(lisina:ácido glutámico); gripe; VP6 de rotavirus, VP1 y VP2 de parvovirus; proteína del núcleo del virus de la hepatitis B; vacuna recombinante del virus de la hepatitis B y similares. De forma alternativa, se puede usar un fragmento o epítipo de una proteína soporte u otra proteína inmunogénica. Por ejemplo, se puede acoplar un péptido hapténico de la invención a un epítipo de células T de una toxina bacteriana, toxoide o CRM. A este respecto, se puede hacer referencia a la patente en EE UU No. 5.785.973.

40 Además, un polipéptido de la invención puede actuar como una proteína soporte en composiciones vacunas dirigidas contra *Neisseria* o contra otras bacterias o virus.

45 Los agentes inmunogénicos de la invención se pueden administrar como vacunas de subunidades multivalentes en combinación con antígenos de *N. meningitidis*, o antígenos de otros organismos incluidos de las bacterias patógenas *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *N. gonorrhoea*, *E. coli*, *S. pneumoniae* etc. De forma alternativa o adicional, se pueden administrar junto con componentes oligosacáridos o polisacáridos de *N. meningitidis*.

50 Las vacunas también pueden contener un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable como se ha definido anteriormente en el presente documento.

55 Las vacunas y composiciones inmunogénicas pueden incluir un adyuvante como se sabe bien en la técnica. Los adyuvantes contemplados por la presente invención incluyen, pero no está limitados a: sustancias tensioactivas tales como hexadecilamina, octadecilamina, ésteres octadecílicos de aminoácidos, lisolecitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, N,N-dioctadecil-N',N'bis(2-hidroxiethyl-propanodiamina), metoxihexadecilglicerol y polioles plurónicos; poliaminas tales como pirano, sulfato de dextrano, poli IC carbopol; péptidos tales como muramil dipéptido y derivados, dimetilglicina, tuftsina; emulsiones en aceite; y geles minerales tales como fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o alumbre; linfoquinas, QuilA y complejos inmunoestimulantes (ISCOMS).

60 Con respecto a los ejemplos de adyuvantes, también se hace referencia a la publicación internacional WO99/36544.

Vacunación por administración de ADN

65 Las construcciones de expresión que comprenden proteínas NhhA modificadas de la invención se pueden administrar a seres humanos para tratar profiláctica y/o terapéuticamente a los huéspedes. A este respecto, las

construcciones de expresión pueden codificar uno o más polipéptidos NhhA modificados, colectivamente denominados como “agentes inmunogénicos”.

Las construcciones de expresión también incluyen construcciones de terapia génica, que emplean vectores de terapia génica especializados tales como vaccinia y vectores víricos útiles en terapia génica. Los últimos incluyen adenovirus y virus adenoasociados (AAV) tal como se describen en Franceschi *et al.*, 2000, J. Cell Biochem. **78** 476, Braun-Falco *et al.*, 1999, Gene Ther. **6** 432, vectores retrovirales y lentivirales tal como se describe en Buchshacher *et al.*, 2000, Blood **95** 2499 y vectores derivados del virus del herpes simple y citomegalovirus. Se puede encontrar una revisión general de los vectores de terapia génica y métodos de administración en Robbins *et al.*, 1998, Trends in Biotech. **16** 35. Una referencia ejemplar que describe un número de vectores potencialmente adecuados para terapia génica usando proteínas de *Neisseria*, y los métodos de administración, es la publicación internacional WO99/36544.

Los agentes inmunogénicos de la invención pueden ser expresados por huésped víricos atenuados. Mediante “huéspedes víricos atenuados” se quiere decir vectores víricos que son de forma natural, o se han hecho, sustancialmente avirulentos. Un virus se puede hacer sustancialmente avirulento por cualquier medio físico (por ejemplo, tratamiento con calor) o químico (por ejemplo, tratamiento con formaldehído). Mediante “sustancialmente avirulento” se quiere decir un virus cuya infectividad se ha destruido. Idealmente, la infectividad del virus se destruye sin afectar a las proteínas que llevan la inmunogenicidad del virus. A partir de lo anterior, se apreciará que los huéspedes víricos atenuados pueden comprender virus vivos o virus inactivados.

Los huéspedes víricos atenuados que pueden ser útiles en una vacuna según la invención pueden comprender vectores víricos incluidos adenovirus, citomegalovirus y preferiblemente poxvirus tales como vaccinia (véase, por ejemplo, Paoletti y Panicali, patente en EE UU No. 4.603.112) y cepas atenuadas de *Salmonella* (véase, por ejemplo, Stocker, patente en EE UU No. 4.550.081). Las vacunas vivas son particularmente ventajosas porque producen un estímulo prolongado que puede conferir inmunidad sustancialmente de largo plazo. Otra referencia que describe una variedad de vectores víricos potencialmente adecuados para la inmunización usando proteínas de *Neisseria*, y los métodos de administración, es la publicación internacional WO99/36544.

Las vacunas multivalentes se pueden preparar a partir de uno o más microorganismos que expresan diferentes epítomos de *N. meningitidis* (por ejemplo, otras proteínas de superficie o epítomos de *N. meningitidis*). Además, se pueden incorporar epítomos de otros microorganismos patógenos en la vacuna.

En una forma de realización preferida, esto implica la construcción de un virus vaccinia recombinante para expresar una secuencia de ácido nucleico según la invención. Tras la introducción en un huésped, el virus vaccinia recombinante expresa el agente inmunogénico, y de esta manera provoca una respuesta LTC en el huésped. Por ejemplo, se puede hacer referencia a la patente en EE UU No. 4.722.848, que describe vectores de vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización.

Una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o inmunización con los agentes inmunogénicos de la invención serán aparentes para los expertos en la materia a partir de la presente divulgación.

En una forma de realización adicional, la secuencia de nucleótidos se puede usar como una vacuna en forma de una vacuna de “ADN desnudo” como se conoce en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir un vector de expresión de la invención en un mamífero, donde causa la producción de un polipéptido *in vivo*, contra el que el huésped monta una respuesta inmune como, por ejemplo, se describe en Barry, M. *et al.*, (1995, *Nature*, **377**:632-635).

Kits de detección

También se describen kits para la detección de *N. meningitidis* en una muestra biológica. Estos contendrán uno o más agentes particulares descritos anteriormente dependiendo de la naturaleza del método de prueba empleado. A este respecto, los kits pueden incluir uno o más de un polipéptido, fragmento, variante, derivado, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ácido nucleico descritos en el presente documento. Los kits también pueden incluir opcionalmente los reactivos adecuados para la detección de marcadores, controles positivos y negativos, soluciones de lavado, tampones de dilución y similares. Por ejemplo, un kit de detección basado en ácido nucleico puede incluir (i) un ácido nucleico según la invención (que se puede usar como un control positivo), (ii) un cebador oligonucleotídico y opcionalmente una ADN polimerasa, ADN ligasa, etc., dependiendo de la técnica de amplificación de ácido nucleico empleada.

Preparación de fragmentos inmunorreactivos

También se describe un método de identificar un fragmento inmunorreactivo de un polipéptido, variante o derivados descritos en el presente documento. Este método esencialmente comprende generar un fragmento del polipéptido, variante o derivado, administrar el fragmento a un mamífero; y detectar una respuesta inmune en el mamífero. Tal respuesta incluirá la producción de elementos que específicamente se unen a *N. meningitidis* y/o dicho polipéptido, variante o derivado, y/o un efecto protector contra la infección por *N. meningitidis*.

5 Antes de probar la inmunorreactividad de un fragmento particular en el método anterior, se pueden usar una variedad de métodos predictivos para deducir si un fragmento particular se puede usar para obtener un anticuerpo que da reacción cruzada con el antígeno nativo. Estos métodos predictivos se pueden basar en la secuencia amino-terminal o carboxi-terminal como, por ejemplo, se describe en el capítulo 11.14 de Ausubel *et al.*, anteriormente. De forma alternativa, estos métodos predictivos se pueden basar en predicciones de hidrofobicidad como, por ejemplo, describen Kyte & Doolittle 1982, J. Mol. Biol. **157** 105 y Hopp & Woods, 1983, Mol. Immunol. **20** 483) o predicciones de estructura secundaria como, por ejemplo, describen Choo & Fasman, 1978, Ann. Rev. Biochem. **47** 251).

10 Además, el “mapeo de epítomos” usa los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento para identificar los epítomos que dan reacción cruzada probando primero su capacidad para proporcionar protección cruzada, seguido por la identificación del epítomo reconocido por dichos anticuerpos. Se proporciona un método ejemplar en Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, anteriormente.

15 En general, los fragmentos de péptidos que consisten en de 10 a 15 residuos proporcionan resultados óptimos. Péptidos tan pequeños como de 6 o tan grandes como de 20 residuos han funcionado con éxito. Tales fragmentos peptídicos se pueden después acoplar químicamente a una molécula soporte tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o seroalbúmina bovina (BSA) como por ejemplo, se describe en las secciones 11.14 y 11.15 de Ausubel *et al.*, anteriormente.

20 También se apreciará que los péptidos se pueden circularizar sintéticamente como, por ejemplo se describe en Hoogerhout *et al.*, 1995, Infect. Immun. **63** 3473.

25 Los péptidos se pueden usar para inmunizar un animal como, por ejemplo, se discute anteriormente. Los títulos de anticuerpo contra el polipéptido nativo o parental del que se seleccionó el péptido se pueden determinar después mediante, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA como, por ejemplo, se describe en las secciones 11.16 y 11.14 de Ausubel *et al.*, anteriormente.

30 Los anticuerpos se pueden purificar después de un líquido biológico relevante del animal mediante fraccionamiento con sulfato de amonio o mediante cromatografía como se sabe bien en la técnica. Los protocolos ejemplares para la purificación de anticuerpos se dan en las secciones 10.11 y 11.13 de Ausubel *et al.*, anteriormente.

35 La inmunorreactividad del anticuerpo contra el polipéptido nativo o parental se puede determinar por cualquier procedimiento relevante tal como, por ejemplo, inmunotransferencia.

Bloqueantes funcionales

40 Se cree que los polipéptidos NhhA/HiaNm salvajes divulgados en el documento WO99/31132 tienen propiedades de adhesina. De hecho tienen algunas similitudes con las adhesinas de *Haemophilus influenzae* que son antígenos de superficie. Específicamente, tienen aproximadamente el 67% de homología a la proteína Hia de *H. influenzae* (Barenkamp & St. Geme III, 1996, Molecular Microbiology **19** 1215), y el 74% de homología a la proteína Hsf de *H. influenzae* (St. Geme III, J. *et al.*, 1996, Journal of Bacteriology **178** 6281; y patente en EE UU No 5.646.259). Para estas comparaciones, se usó un peso de hueco de 3 y un peso de longitud de 0,01 usando el programa GAP (Deveraux, 1984, anteriormente). Por tanto, la interrupción de la función de estos polipéptidos sería de beneficio terapéutico significativo ya que prevendrían que las bacterias *N. meningitidis* se adhirieran a e invadieran células. La interrupción de la función se puede efectuar de varias maneras.

50 Por ejemplo, se pueden administrar grupos tales como reactivos químicos o polipéptidos que bloquean receptores en la superficie celular que interaccionan con un polipéptido de la invención. Estos computen con el organismo infectivo por los sitios del receptor. Tales grupos pueden comprender, por ejemplo, polipéptidos de la invención, en particular fragmentos, o equivalentes funcionales de estos, así como miméticos.

55 El término “miméticos” se usa en el presente documento para referirse a productos químicos que se diseñan para parecerse a regiones funcionales particulares de las proteínas o péptidos. También se pueden usar anticuerpos anti-idiotípicos hechos contra los anticuerpos descritos anteriormente que bloquean la unión de las bacterias a la superficie celular. De forma alternativa, los grupos que interaccionan con los sitios de unión del receptor en los polipéptidos de la invención pueden prevenir eficazmente la infección de una célula por *N. meningitidis*. Tales grupos pueden comprender anticuerpos, péptidos u otros reactivos químicos bloqueantes.

60 Se pueden usar todos esos grupos, composiciones farmacéuticas en las que se combinan con soportes farmacéuticamente aceptables, en métodos de tratamiento de pacientes que padecen infección por *N. meningitidis* mediante la administración de tales grupos o composiciones.

65 Los polipéptidos de la invención se pueden usar en el cribado de compuestos para su uso en los métodos anteriores. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención se pueden combinar con un marcador y exponer a un cultivo celular en presencia de un reactivo en prueba. La capacidad del reactivo de inhibir la unión del polipéptido marcado

a la superficie celular se puede observar después. En tal cribado, los polipéptidos marcados se pueden usar directamente en un organismo tal como *E. coli*. De forma alternativa, se puede manipular la propia *N. meningitidis* para que exprese una forma modificada y detectable del polipéptido. El uso de cepas de *N. meningitidis* manipuladas en este métodos se prefiere ya que es más probable que la estructura terciaria de la proteína se parezca más a la expresada en las bacterias salvajes.

Para que la invención se entienda fácilmente y se ponga en efecto práctico ahora se describirán formas de realización preferidas particulares a modo de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Identificación de las regiones variables y constantes de los polipéptidos NhhA

Los inventores presentes han elucidado las secuencias de aminoácidos de de NhhA que están conservadas y/o no conservadas entre diez (10) cepas de *N. meningitidis*. Las regiones no conservadas se subdividen en cuatro regiones variables (V1, V2, V3 y V4) y las regiones conservadas se subdividen en C1, C2, C3, C4 y C5 (como se muestra en la figura 1 y la tabla 1; SEQ ID NO: 1-11). La comparación de secuencias de nucleótidos correspondientes se muestra en la figura 2 (SEQ ID NO: 12-22).

Ejemplo 2

Sobreexpresión de polipéptido NhhA de PMC 21

La proteína NhhA codificada por el gen *nhhA* de la cepa PMC21 de *N. meningitidis* se sobreexpresó haciendo una construcción de expresión en donde el gen *nhhA* está operativamente unido a un promotor.

Se usaron los siguientes cebadores oligonucleotídicos para amplificar un marco abierto de lectura del ácido nucleico *nhhA* de la cepa PMC21 de *N. meningitidis* por PCR:

HOMP5': 5'-CAA TTA ACG GCC GAA TAA AAG GAA GCC GAT **ATG AAC AAA ATA TAC CGC ATC**-3' (SEQ ID NO 40); que contiene un sitio de restricción *EagI* (subrayado) y la secuencia que codifica los primeros 7 (siete) aminoácidos de NhhA (negrita)

HOMP3'AN: 5'-TGG AAT CCA TGG **AAT CGC CAC CCT TCC CTT C**-3' (SEQ ID NO 41); que contiene un sitio de restricción *NcoI* (subrayado) y el complemento inverso de la secuencia de los nucleótidos 48-61 pasado el final del marco abierto de lectura de *nhhA* de la cepa ϕ 3 (negrita).

El producto de amplificación contenía sitios de restricción que se digirieron posteriormente con las endonucleasas de restricción *EagI* y *NcoI*.

El plásmido usado para subclonar fue pCO14K, plásmido que contiene un promotor *porA* antes del gen que codifica la proteína de membrana externa de clase 1 fuertemente expresada de *N. meningitidis* junto con la secuencia flanqueante de la cepa 2996 de *N. meningitidis* y un gen de selección de resistencia a kanamicina como describen Rouppe van der Voort, *et al.*, Infect Immun 1996 **64** 2745.

El producto de amplificación digerido se ligó después en pCO14K digerido con las endonucleasas de restricción *EagI* y *NcoI*. La ligación produjo la sustitución de la mayor parte del marco abierto de lectura de *porA* con el producto de amplificación de *nhhA* (figura 3). Esto creó una construcción de expresión de ácido nucleico recombinante (marco abierto de lectura mostrado en SEQ ID NO 12) que codifica un polipéptido de 591 aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 1.

Esto coloca la expresión del ácido nucleico *nhhA* de la invención bajo el control del promotor fuerte *porA*. La traducción empieza en el codón ATG que empieza en la posición 31 de HOMP5'. Para prevenir la formación de una fusión entre *porA* y *nhhA*, la secuencia HOMP5' contiene un codón de terminación TAA antes del ATG iniciador descrito anteriormente.

El plásmido resultante, pIP52(PMC21), se linealizó por digestión de restricción y se usó para transformar la cepa 7G2 de *N. meningitidis* usando el método descrito por Janik *et al.*, 1976, Journal of Clinical Microbiology **4** 71. Los transformantes se seleccionaron mediante incubación durante la noche a 37°C en CO₂ al 5% en medio sólido que contenía kanamicina 100 µg/ml. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina, se subcultivaron durante la noche y se cribaron para la sobreexpresión del polipéptido NhhA separando proteínas celulares totales electroforéticamente en SDS-PAGE al 10% seguido por transferencia a nitrocelulosa usando un aparato de transferencia semiseco (BioRad). La membrana se incubó después secuencialmente con suero anti-NhhA de conejo (como se describe en la publicación internacional WO99/31132) y anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) antes de la detección colorimétrica con NBT/BCIP (Sigma). Se aisló un clon que expresaba el polipéptido NhhA a un nivel más alto comparado con la cepa parental (Figura 11). El análisis de la secuencia de

aminoácidos predicha usando el programa de ordenador SIGCLEAVE (parte de la suite de programas eGCG hospedadas en www.angis.org.au) indica que los primeros 51 aminoácidos se cortarán para producir el polipéptido maduro (figura 14; SEQ ID NO: 33).

- 5 La construcción del plásmido pIP52(PMC21) se puede transformar en cualquier cepa competente para transformación de *N. meningitidis*.

Ejemplo 3

10 **Sobreexpresión del polipéptido NhhA de H41**

La proteína NhhA codificada por el gen *nhhA* de la cepa H41 de *N. meningitidis* se sobreexpresó usando los mismos métodos descritos en el ejemplo 2. Esto creó una construcción de expresión de ácido nucleico recombinante (marco abierto de lectura mostrado en SEQ ID NO: 13) que codifica un polipéptido de 591 aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2. En este ejemplo, el plásmido resultante pIP52(H41) se linealizó, y se transformó en la cepa 7G2 de *N. meningitidis*. Se analizaron colonias resistentes a kanamicina y se eligió una que cuando se examinó por inmunotransferencia, demostró sobreexpresión de NhhA (figura 11). El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha usando el programa de ordenador SIGCLEAVE (parte de la suite de programas eGCG hospedadas en www.angis.org.au) indica que los primeros 51 aminoácidos se cortarán para producir el polipéptido maduro (figura 14; SEQ ID NO: 34).

Esta estrategia se puede emplear para crear construcciones de expresión que contienen la secuencia *nhhA* salvaje de otras cepas de *N. meningitidis*.

25 Ejemplo 4

Construcción de un mutante de delección de NhhA usando sitios de restricción convenientes

Para que sirva como referencia, la secuencia de aminoácidos del polipéptido NhhA codificada por el ácido nucleico *nhhA* de la cepa PMC21 se muestra en SEQ ID NO 1. Los presentes inventores crearon una versión mutante de delección de *nhhA* de PMC21 salvaje, en la que la región más variable entre cepas se delecionó. Se generó un producto de amplificación que codifica los aminoácidos 1-54 del polipéptido NhhA de PMC21 salvaje mediante amplificación por PCR del molde de ácido nucleico *nhhA* usando los siguientes cebadores:

35 HOMP5': 5'-CAA TTA ACG GCC GAA TAA AAG GAA GCC GAT ATG AAC AAA ATA TAC CGC ATC-3' (SEQ ID NO 40); que es el mismo oligonucleótido usado para crear la construcción de sobreexpresión pIP52.

40 NH3'BG: 5'-GGT CAG ATC TGT TTC ATT GTT AGC ACT TGC-3' (SEQ ID NO 42); que contiene un sitio de restricción *Bgl*II (subrayado) y el complemento inverso de la secuencia que codifica los aminoácidos 134 (doble subrayado) y 49-54 de NhhA de PMC21 salvaje (negrita).

El producto de amplificación resultante incluía sitios de endonucleasas de restricción *Eag*I y *Bgl*II. pIP52(PMC21) incluye un único sitio *Eag*I 20 pb antes del inicio del marco abierto de lectura (ORF) de *nhhA* y un único sitio *Bgl*II localizado en el ORF (véase la figura 3B). Por tanto, pIP52(PMC21) y el producto de amplificación se sometieron a digestión con endonucleasas de restricción con *Eag*I y *Bgl*II, se ligaron y se usaron para transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α competentes; esto sustituye el fragmento *Eag*I/*Bgl*II de pIP52(PMC21) con el producto de PCR. Esto creó una construcción de expresión de ácido nucleico recombinante (marco abierto de lectura mostrado en la figura 5; SEQ ID NO: 28) que codifica un polipéptido de 512 aminoácidos como se muestra en la figura 5 (SEQ ID NO: 23). Esta secuencia de aminoácidos incluye los aminoácidos 1-54 y 134-592 de la secuencia salvaje, y por tanto deleciona la mayor parte de la región V1, todo de las regiones V2 y C2, y parte de la región C3 del polipéptido NhhA de PMC21 salvaje.

Este plásmido de linealizó por digestión de restricción y se transformó en la cepa 7G2 de *N. meningitidis*. Usando los métodos descritos en el ejemplo 1, se aisló un clon que sobreexpresa la NhhA de PMC21 truncada (figura 11).

El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha usando el programa de ordenador SIGCLEAVE (parte de la suite de programas eGCG hospedadas en www.angis.org.au) indica que los primeros 51 aminoácidos se cortarán para producir el polipéptido maduro (figura 14; SEQ ID NO: 35). Para confirmar la presencia de una secuencia señal cortable y para confirmar la identidad de la proteína sobreexpresada, se semipurificaron proteínas de la membrana externa aislando la fracción que es insoluble en el detergente sarcosil.

Las proteínas de membrana aisladas se separaron electroforéticamente antes de transferirlas a membranas de nailon. La posición de la proteína sobreexpresada se reveló por tinción con Coomassie. Esta región de la membrana se cortó y la proteína se secuenció en el N-terminal. Los primeros once aminoácidos de esta proteína eran XXETDLT Σ VTG que corresponde a los residuos de aminoácidos 52 a 62 (inclusive) de la secuencia de aminoácidos predicha que va a expresar la construcción de sobreexpresión como se define en este ejemplo.

Este es un ejemplo de una delección usando sitios de restricción existentes en la secuencia polinucleotídica. Esta construcción se puede transformar en cualquier *N. meningitidis* competente para transformación.

Ejemplo 5

Construcción de un mutante de delección de *NhhA* usando sitios de restricción convenientes

Se hizo una construcción de expresión que contenía la secuencia *nhhA* salvaje de H41 como se describe en el ejemplo 2. La construcción de expresión resultante se nombró pIP52(H41). Se hizo un mutante de delección, usando la estrategia esbozada en este ejemplo. En este caso los cebadores oligonucleotídicos usados fueron:

HOMP5': 5'-CAA TTA ACG GCC GAA TAA AAG GAA GCC GAT ATG AAC AAA ATA TAC CGC ATC-3' (SEQ ID NO 40); que es el mismo oligonucleótido usado para crear la construcción de sobreexpresión pIP52.

NH3'STU: GAT CAG GCC TGT ATC TTC ATC GGT AGC ATT -3' (SEQ ID NO 43); que contiene un sitio de restricción *StuI* (subrayado) y el complemento inverso de la secuencia que codifica los aminoácidos 134 (doble subrayado) y 49-54 de *NhhA* de H41 salvaje (negrita).

El producto de amplificación resultante contiene sitios únicos de endonucleasas de restricción *EagI* y *StuI*. La construcción de expresión pIP52(H41) contiene estos sitios de restricción. Por tanto, pIP52(H41) y el producto de amplificación se sometieron a digestión con endonucleasas de restricción con *EagI* y *StuI*, se ligaron y se usaron para transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α competentes; esto sustituye el fragmento *EagI/StuI* de pIP52(H41) con el producto de PCR. Esto creó una construcción de expresión de ácido nucleico recombinante (marco abierto de lectura mostrado en la figura 6 y SEQ ID NO: 29) que codifica un polipéptido de 513 aminoácidos como se muestra en la figura 6 y SEQ ID NO: 24. Esta secuencia de aminoácidos incluye los aminoácidos 1-54 y 134-593 de la secuencia salvaje, y por tanto deleciona la mayor parte de la región V1, todo de las regiones V2 y C2, y parte de la región C3 del polipéptido *NhhA* de H41 salvaje.

Este plásmido de linealizó por digestión de restricción y se transformó en la cepa 7G2 de *N. meningitidis*. Usando los métodos descritos en el ejemplo 1, se aisló un clon que sobreexpresa la *NhhA* de H41 truncada (figura 11).

El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha usando el programa de ordenador SIGCLEAVE (parte de la suite de programas eGCG hospedadas en www.angis.org.au) indica que los primeros 51 aminoácidos se cortarán para producir el polipéptido maduro (figura 14; SEQ ID NO: 36).

Esta construcción se puede transformar en cualquier *N. meningitidis* competente.

Ejemplo 6

Construcción de un mutante de delección de *NhhA* usando PCR de ajuste-solapamiento

Además de usar sitios de restricción convenientes para deleccionar regiones variables de los nucleótidos que codifican *NhhA*, también se pueden construir mutantes mediante el uso de PCR "por extensión de solapamiento de ajuste", como describen Ho *et al.*, 1989, anteriormente y Horton R.M., *et al.*, 1989, anteriormente. De esta manera, se pueden generar polinucleótidos que codifican las regiones constantes, pero que tienen las regiones variables delecionadas (véase la figura 5A, 5B, 5C).

En este ejemplo, se hizo una construcción que contenía las regiones C1 y C5, y todas las otras regiones delecionadas (véase la figura 5A).

Se usaron los siguientes cebadores oligonucleotídicos en las reacciones de PCR correspondientes a la región C1 (véase la figura 1) a partir del ADN cromosómico de la cepa PMC21:

HOMP5': 5'-CAA TTA ACG GCC GAA TAA AAG GAA GCC GAT ATG AAC AAA ATA TAC CGC ATC-3' (SEQ ID NO 40); que es el mismo oligonucleótido usado para crear la construcción de sobreexpresión pIP52(PMC21).

SO-C: 5'-GAC GAA ATC AAC GTT CTT AGC ACT TGC CTG AAC CGT TGC-3' (SEQ ID NO 44); secuencia que es el complemento inverso de la secuencia que codifica los aminoácidos 237-241 en el inicio de la región C5 (subrayado) y los aminoácidos 45-52 al final de la región C1 (negrita) de *NhhA* salvaje de la cepa PMC21.

El producto de amplificación de esta reacción es HOMP5'/SO-C.

Se usaron los siguientes cebadores oligonucleotídicos en las reacciones de PCR para amplificar C5 a partir del ADN cromosómico de la cepa PMC21:

SO-D: 5'-AAC GTT GAT TTC GTC CGC ACT TAC-3' (SEQ ID NO 45); que codifica los aminoácidos 237-244 en el inicio de C5 (el subrayado indica complemento inverso del cebador SO-C);

5 HO3'AN: 5'-TGG AAT CCA TGG AAT CGC CAC CCT TCC CTT C-3' (SEQ ID NO 41); que es el mismo cebador usado en la construcción de pIP52.

El producto de amplificación de esta reacción es SO-D/HO3'AN.

10 Los productos de amplificación HOMP5'/SO-C y SO-D/HO3'AN se purificaron de un gel de agarosa después de la separación por electroforesis, se mezclaron, y sometieron a amplificación posterior usando los cebadores HOMP5' y HO3'AN. El producto de amplificación resultante codifica los aminoácidos 1-52 y 337-591 de NhhA salvaje de PMC21. Este producto de amplificación se sometió a digestión de restricción con *EagI* y *NcoI*, y se clonó en pCO14K, como se describe en el ejemplo 1. Esta molécula recombinante contiene las regiones C1 y C5, por tanto delecionando las regiones V1 a 4 y C2 a 4. La secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura se muestra en la figura 7 y SEQ ID NO 30, y la secuencia polipeptídica predicha derivada de esta secuencia de nucleótidos se muestra en la figura 7 y SEQ ID NO 25.

20 Este plásmido se linealizó por digestión de restricción y se transformó en la cepa 7G2 de *N. meningitidis*. Usando los métodos descritos en el ejemplo 2, se aisló un clon que sobreexpresa la NhhA de PMC21 truncada.

El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha usando el programa de ordenador SIGCLEAVE (parte de la suite de programas eGCG hospedadas en www.angis.org.au) indica que los primeros 51 aminoácidos se cortarán para producir el polipéptido maduro (figura 14; SEQ ID NO: 37).

25 Esta construcción se puede transformar en cualquier *N. meningitidis* competente para transformación.

Ejemplo 7

Construcción de un mutante de delección de NhhA usando PCR de ajuste-solapamiento

30 Se apreciará que se puede usar una estrategia similar para crear polinucleótidos recombinantes que codifican varias regiones de NhhA. Se puede hacer una construcción que comprende las regiones C1, C4, V4 y C5 usando la siguiente estrategia (véase la figura 5B):

35 La región C1 se amplifica usando los cebadores oligonucleotídicos:

HOMP5': 5'-CAA TTA ACG GCC GAA TAA AAG GAA GCC GAT ATG AAC AAA ATA TAC CGC ATC-3' (SEQ ID NO 40);

40 SO-E: 5'-AAC GCT TGC CGC ACG **CTT AGC ACT TGC CTG CAA CGT TGC**-3' (SEQ ID NO 46); que codifica el complemento inverso de los aminoácidos 211-215 al inicio de la región C4 (subrayado) y al final de la región C1 (negrita) de la cepa PMC21.

45 El producto de amplificación de esta reacción es HOMP5'/SO-E.

Se usan los siguientes cebadores oligonucleotídicos en las reacciones de PCR para amplificar la región C4-V4-C5 a partir del ADN cromosómico de la cepa PMC21:

50 SO-F: 5'-CGT GCG GCA AGC GTT AAA GAC GTA-3' (SEQ ID NO 47); que codifica los aminoácidos 2311-218 al inicio de C4 (el subrayado indica el complemento inverso del cebador SO-E),

HO3'AN: 5'-TGG AAT CCA TGG AAT CGC CAC CCT TCC CTT C-3' (SEQ ID NO 41).

55 El producto de amplificación de esta reacción es SO-F/HOMP3'.

60 Los productos de amplificación HOMP5'/SO-E y SO-F/HO3'AN se purificarán de un gel de agarosa después de la separación por electroforesis, y se mezclarán, y someterán a amplificación posterior usando los cebadores HOMP5' y HO3'AN. El producto resultante codifica los aminoácidos 1-52 y 211-591 de NhhA salvaje de PMC21. Este producto de amplificación se someterá a digestión de restricción con *EagI* y *NcoI*, y se clonará en pCO14K. Esta molécula recombinante contiene las regiones C1, C4, V4 y C5, por tanto delecionando las regiones V1-3 y C2-3. La secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura se muestra en la figura 8 y SEQ ID NO 31, y la secuencia polipeptídica predicha derivada de esta secuencia de nucleótidos se muestra en la figura 8 y SEQ ID NO 26. El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha usando el programa de ordenador SIGCLEAVE (parte de la suite de programas eGCG hospedadas en www.angis.org.au) indica que los primeros 51 aminoácidos se cortarán para producir el polipéptido maduro (figura 14; SEQ ID NO: 38).

Esta construcción se puede transformar en cualquier *N. meningitidis* competente para transformación.

Ejemplo 8

5 **Construcción de un mutante de delección de *NhhA* usando PCR de ajuste-solapamiento**

Se apreciará que se puede usar una estrategia similar para crear polinucleótidos recombinantes que codifican varias regiones de *NhhA*. Se puede hacer una construcción que comprende las regiones C1, C2, C3, C4 y C5 usando la siguiente estrategia (véase la figura 5C):

10 C1 y C2 se amplificarán usando los cebadores oligonucleotídicos:
 HOMP5': 5'-CAA TTA ACG GCC GAA TAA AAG GAA GCC GAT ATG AAC AAA ATA TAC CGC ATC-3' (SEQ ID NO 40);

15 SO-G: 5'- CAG CGA GTA GGT GAA **TTG TTT GAT TTT CAG GTT GTC GCC GGC TTT GAG GGT** GTT AGC ACT TGC CTG AAC CGT-3' (SEQ ID NO 48); que codifica el complemento inverso de los aminoácidos 125-129 en el inicio de la región C3 (subrayado), toda la región C2 (aminoácidos 109-120, negrita y doble subrayado) y el final de la región C1 (aminoácidos 46-52, negrita) de la cepa PMC21.

20 El producto de amplificación de esta reacción es HOMP5'/SO-G.

Las regiones C3 y parte de C4 se amplificarán usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

25 SO-H: 5'-TTC ACC TAC TCG CTG AAA AAA GAC-3' (SEQ ID NO 49); que codifica los aminoácidos 125-132 al inicio de C3 (el subrayado indica el complemento inverso del cebador SO-G)

30 SO-I: 5'- **GCC AGC GTT TAA TAC GTC TTT AAC GCT TGC CGC ACG** ATC GGT CAA AGT CGA ACC AAT -3' (SEQ ID NO 50); que codifica el complemento inverso de los aminoácidos 182-188 al final de C3 (subrayado) y aminoácidos 211-222 de C4 (negrita).

El producto de amplificación de esta reacción es SO-H/SO-I.

35 Los productos de amplificación HOMP5'/SO-G y SO-H/SO-I se purifican de un gel de agarosa después de la separación por electroforesis, se mezclan, y someten a amplificación posterior usando los cebadores HOMP5' y SO-I para dar un producto que codifica los aminoácidos 1-52, 103-114, 125-188 y 211-22, es decir, las regiones C1, C2, C3 y parte de C4. El producto de amplificación de esta reacción es HOMP5'/SO-I.

Las regiones C5 y parte de C4 se amplifican usando los siguientes cebadores:

40 SO-J: 5' GTA TTA AAC GCT GGC TGG AAC ATT AAA GGC GTT AAA **AAC GTT GAT TTC GTC CGC ACT**-3' (SEQ ID NO 51); que codifica los aminoácidos 218-229 de C4 (subrayado) y aminoácidos 237-243 de C5 (negrita) de *NhhA* salvaje de la cepa PMC21. (El tipo subrayado en negrita indica el complemento inverso de SO-I).

45 HO3'AN: 5'-TGG AAT CCA TGG AAT CGC CAC CCT TCC CTT C-3' (SEQ ID NO 41).

El producto de amplificación de esta reacción es SO-J/HO3'AN.

50 Los productos de amplificación HOMP5'/SO-I y SO-J/HO3'AN se purificarán de un gel de agarosa después de la separación por electroforesis, y se mezclarán, y someterán a amplificación posterior usando los cebadores HOMP5' y HO3'AN. El producto resultante codifica los aminoácidos 1-52, 103-114, 125-188, 211-229 y 237-591 de *NhhA* salvaje de la cepa PMC21. Este producto de amplificación se someterá a digestión de restricción con *EagI* y *NcoI*, y se clonará en pCO14K. Esta molécula recombinante contiene las regiones C1, C2, C3, C4 y C5, por tanto delecionando las regiones V1, V2, V3 y V4. La secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura se muestra en la figura 9 y SEQ ID NO 32, y la secuencia polipeptídica predicha derivada de esta secuencia de nucleótidos se muestra en la figura 9 y SEQ ID NO 27. El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha usando el programa de ordenador SIGCLEAVE (parte de la suite de programas eGCG hospedadas en www.angis.org.au) indica que los primeros 51 aminoácidos se cortarán para producir el polipéptido maduro (figura 14; SEQ ID NO: 39).

60 Esta construcción se puede transformar en cualquier *N. meningitidis* competente para transformación.

Ejemplo 9**Purificación de polipéptidos NhhA sobreexpresados**

5 Se puede aislar un polipéptido NhhA recombinante descrito en los ejemplos anteriores mediante el siguiente procedimiento. Las bacterias se cultivan durante la noche (12-14 horas) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. (En este ejemplo, el medio era BHI agar suplementado con base de Leventhal. Los expertos en la materia conocen bien otros medios de crecimiento). Se recogieron las bacterias de diez placas de agar de 25 ml y se resuspendieron en 25 ml de Tris 10 mM ajustado a pH 8,0 con HCl. Se añadió un volumen igual de Tris 10 mM (pH 8,0) que contenía sarcosil al 2% y la mezcla se mezcló suavemente durante 1 hora a 4°C. Esto se centrifugó a 100.000 x g durante setenta minutos a 20°C y el sobrenadante se desechó. El precipitado se resuspendió en 25 ml de Tris 10 mM (pH 8,0) que contenía sarcosil al 1% pasando a través de una aguja de calibre 25. Esto se centrifugó a 100.000 x g durante setenta minutos a 20°C y el sobrenadante se desechó. El precipitado se resuspendió en 10 ml de Tris 10 mM (pH 8,0) que contenía sarcosil al 1% pasando a través de una aguja de calibre 25. Esta fracción contiene los componentes de la célula insolubles en sarcosil, y está enriquecida en proteínas de membrana externa. (Se puede incorporar un paso adicional para eliminar el detergente sarcosil residual, por lo que la solución de proteínas se dializa durante cuatro ciclos de 4-8 horas contra 100-1000 volúmenes de, por ejemplo, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 o PBS (solución salina tamponada en fosfato) a 4°C.

10

15

20 Tras determinar la concentración de proteína en la suspensión por absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, o usando el kit BCA (Pierce), aproximadamente 1 ml de la solución que contiene 10 mg de proteína en una solución que contiene SDS (lauril sulfato de sodio) al 1%, β-mercaptoetanol al 2% se separó en SDS-PAGE al 6% de 1,5 mm de espesor en el aparato mini-protean II de BioRad. La NhhA de alto peso molecular se eluyó del gel usando "mini Whole gel Eluter" de BioRad. Aproximadamente el 10% de cada fracción eluida se comprobó por separación por SDS-PAGE seguido por tinción con Coomassie. Las fracciones que contenían NhhA esencialmente libre de otras proteínas se juntaron. Este procedimiento se llevó a cabo para aislar NhhA madura sobreexpresada como se describe en el ejemplo 2 (SEQ ID NO: 1), NhhA madura con delección *BglI* sobreexpresada como se describe en el ejemplo 4 (SEQ ID NO: 23) y mutante de delección de NhhA sobreexpresada como se describe en el ejemplo 6 (SEQ ID NO: 25). Las proteínas aisladas se muestran en la figura 12.

25

30

Ejemplo 10**Inmunogenicidad de los polipéptidos mutantes de delección de NhhA purificados**

35 Se inocularon ratones con los polipéptidos NhhA salvajes y los mutantes de delección descritos en los ejemplos anteriores purificados. En un grupo, cada ratón Balb/C se inoculó por vía subcutánea con aproximadamente 130 µg de NhhA de PMC21 con MPL + adyuvante TDM™ (obtenido de Sigma-Aldrich) el día 0, 115 µg el día 14. En un segundo grupo, cada ratón se inoculó con aproximadamente 120 µg de proteína con MPL + adyuvante TDM™ (obtenido de Sigma-Aldrich) el día 0 y 190 µg el día 14. En un tercer grupo, cada ratón se inoculó con aproximadamente 260 µg de proteína con MPL + adyuvante TDM™ (obtenido de Sigma-Aldrich) el día 0 y 1240 µg el día 14. Se tomaron muestras de sangre el día 21 y se extrajo el suero. Se probó la presencia de anticuerpos que reconocen NhhA de PMC21 de longitud completa en estos sueros mediante inmunotransferencia (figura 13). Las preparaciones OMC (5 mg) de P6 (sobreexpresa NhhA de PMC21) y la cepa 2A (expresión de NhhA abolida) se separaron por SDS-PAGE al 6% usando el aparato de electroforesis Mini Protean II de BioRad. Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa electroforéticamente y el filtro se cortó en tiras de 3 mm, después se bloqueó en leche desnatada al 5% en PBS. Los sueros de ratón se diluyeron 1:1000 y 1:10000 en leche en polvo desnatada al 5% y se incubaron con las tiras de nitrocelulosa. La unión del anticuerpo se detectó usando anti-IgG de ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) antes de la detección colorimétrica con NBT/BCIP (Sigma). Como se puede ver de la figura 13, es posible provocar una respuesta inmune contra el polipéptido NhhA de PMC21 maduro de longitud completa inoculando con mutantes de delección de NhhA o polipéptidos NhhA maduros de longitud completa.

40

45

50

Ejemplo 11**Expresión de un polipéptido mutante de delección en *E. coli***

55 Además de la expresión de los polipéptidos mutantes de la invención en *N. meningitidis*, también se pueden expresar en bacterias *E. coli*. Cualquiera de los mutantes de delección de *nhhA* de los ejemplos 4-8 se puede usar como molde para la amplificación por PCR. Los cebadores oligonucleotídicos usados pueden ser los descritos en la publicación internacional WO99/31132 (tal como SEQ ID NO 24 y SEQ ID NO 25 de ese documento). El producto de amplificación se puede digerir por restricción con las enzimas *BamHI/HindIII* y ligar con el plásmido pMALC2 (New England Biolabs) digerido por restricción con *BamHI/HindIII*, y el plásmido resultante transformar en la cepa de *E. coli* DH5α competente. La cepa resultante se puede inducir a expresar altos niveles de proteína recombinante usando las condiciones recomendadas por el fabricante de pMALC2. La proteína recombinante resultante es una fusión de la proteína de unión a maltosa y el polipéptido NhhA mutante de delección. Esta se puede semipurificar por separación en SDS-PAGE seguido por electroelución usando el Mini-Gel Electro-eluter (BioRad) según las

60

65

instrucciones del fabricante. La proteína de fusión semipurificada se puede dializar después contra PBS, antes de la digestión con la enzima proteasa factor Xa para cortar el grupo de la proteína de unión a maltosa de la proteína NhhA recombinante. La proteína NhhA recombinante se puede purificar por métodos estándar, como por ejemplo, describe R. K. Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, Nueva York, NY USA, 1993).

5

TABLA 1

	C1	V1	C2	V2	C3	V3	C4	V4	C5
Consenso SEQ ID NO: 11	1-50	51-108	109-120	121-134	135-198	199-220	221-239	240-248	249-604
PMC21 SEQ ID NO: 1	1-50	51-108	109-120	121-124	125-188	189-210	211-229	230-236	237-591
H41 SEQ ID NO: 2	1-50	51-102	103-114	115-124	125-188	189-210	211-229	230-236	237-591
P20 SEQ ID NO: 3	1-50	51-105	106-117	118-121	122-185	186-205	206-224	225-234	235-589
EG327 SEQ ID NO: 4	1-50	51-104	105-116	117-126	127-190	191-212	213-231	232-238	239-594
EG329 SEQ ID NO: 5	1-50	51-108	109-120	121-124	125-188	189-210	211-229	230-236	237-591
H38 SEQ ID NO: 6	1-50	51-105	106-117	118-131	132-195	196-217	218-236	237-243	244-599
H15 SEQ ID NO: 7	1-50	51-104	105-116	117-130	131-194	195-216	217-235	236-242	243-598
BZ10 SEQ ID NO: 8	1-50	51-104	105-116	117-130	131-194	195-216	217-235	236-242	243-598
BZ198 SEQ ID NO: 9	1-50	51-104	105-116	117-126	127-190	191-212	213-231	232-238	239-594
Z2491 SEQ ID NO: 10	1-50	51-102	103-114	115-124	125-188	189-208	209-227	228-236	237-592

TABLA 2

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile,
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada seleccionada de
 - 5 (a) una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; o
 - (b) una proteína aislada que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35.
2. Una proteína de fusión que consiste en la proteína aislada según la reivindicación 1 y un compañero de fusión que no deriva de *N. meningitidis*.
- 10 3. La proteína de fusión según la reivindicación 2 en donde el compañero de fusión se selecciona del grupo que consiste en proteína A, glutatión S-transferasa, parte Fc de IgG humana, proteína de unión a maltosa, hexahistidina, proteína fluorescente verde, una etiqueta epítipo c-myc, una etiqueta epítipo de hemaglutinina del virus de la gripe y una etiqueta FLAG.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas aisladas según la reivindicación 1 o proteínas de fusión de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 que es una vacuna.
6. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína aislada según la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 2 o la reivindicación 3.
- 25 7. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 6 que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:28.
8. Una construcción de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 6 o la reivindicación 7 operativamente unido a un promotor.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende la construcción de expresión de la reivindicación 8 y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, que es una vacuna.
- 35 11. Una célula huésped que comprende la construcción de expresión de la reivindicación 8.
12. La célula huésped de la reivindicación 11 que es una bacteria.
- 40 13. La célula huésped de la reivindicación 12 que es *Neisseria meningitidis*.
14. Un método de producir una proteína recombinante que incluye los pasos de:
 - (i) cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 11-13 de modo que dicha proteína recombinante se exprese en dicha célula huésped; y
 - 45 (ii) aislar dicha proteína recombinante.
15. La proteína aislada de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por *N. meningitidis*.
- 50 16. La construcción de expresión de la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por *N. meningitidis*.
17. Uso de la proteína aislada de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por *N. meningitidis*.
- 55 18. Uso de la construcción de expresión de la reivindicación 8 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por *N. meningitidis*.
- 60 19. La proteína aislada, proteína de fusión, construcción de expresión o uso de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde la infección por *N. meningitidis* es en un ser humano.
20. Un método para diagnosticar la infección de un mamífero por *N. meningitidis*, dicho método comprende los pasos de:

- (i) poner en contacto una muestra biológica de un individuo con una proteína aislada según la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 2 o la reivindicación 3; y
- (ii) determinar la presencia o ausencia de un complejo entre dicha proteína aislada o dicha proteína de fusión y anticuerpos específicos de *N. meningitidis* en dicha muestra, en donde la presencia de dicho complejo es indicativa de dicha infección.

5

21. Un método para detectar *N. meningitidis* en una muestra biológica obtenida de un paciente, dicho método comprende el paso de usar un ácido nucleico aislado según la reivindicación 6 o la reivindicación 7 para detectar *N. meningitidis* en dicha muestra biológica.

10

22. El método de la reivindicación 20, en donde el mamífero es un ser humano.

	1				50
EG327	MNKIYRIIWN	SALNAWVAVS	ELTRNHTKRA	SATVATAVLA	TLLFATVQAS.
BZ198	MNKIYRIIWN	SALNAWVVVS	ELTRNHTKRA	SATVATAVLA	TLLFATVQAN
BZ10	MNKISRIIWN	SALNAWVVVS	ELTRNHTKRA	SATVATAVLA	TLLFATVQAN
H15	MNKIYRIIWN	SALNAWVVVS	ELTRNHTKRA	SATVATAVLA	TLLFATVQAN
EG329	MNEILRIIWN	SALNAWVVVS	ELTRNHTKRA	SATVKTAVLA	TLLFATVQAS
PMC21	MNKIYRIIWN	SALNAWVVVS	ELTRNHTKRA	SATVKTAVLA	TLLFATVQAS
H38	MNKIYRIIWN	SALNAWVAVS	ELTRNHTKRA	SATVKTAVLA	TLLFATVQAN
P20	MNKIYRIIWN	SALNAWVVVS	ELTRNHTKRA	SATVATAVLA	TLLSATVQAN
Z2491	MNKIYRIIWN	SALNAWVAVS	ELTRNHTKRA	SATVKTAVLA	TLLFATVQAN
H41	MNKIYRIIWN	SALNAWVAVS	ELTRNHTKRA	SATVKTAVLA	TLLFATVQAN
Consenso	<u>MN-I-RIIWN</u>	<u>SALNAWV-VS</u>	<u>ELTRNHTKRA</u>	<u>SATV-TAVLA</u>	<u>TLL-ATVOA-</u>

C1

	51				100
EG327	TTDDD...DL	YLEPVQRTAV	VLSFRSDKEG	TGEKE.VTED	SNWGVYFDKK
BZ198	ATDDD...DL	YLEPVQRTAV	VLSFRSDKEG	TGEKE.GTED	SNWAVYFDEK
BZ10	ATDDD...DL	YLEPVQRTAV	VLSFRSDKEG	TGEKE.GTED	SNWAVYFDEK
H15	ATDDD...DL	YLEPVQRTAV	VLSFRSDKEG	TGEKE.GTED	SNWAVYFDEK
EG329	ANNEEQEEDL	YLDPVLRVTA	VLIVNSDKEG	TGEKEKVEEN	SDWAVYFNEK
PMC21	ANNEEQEEDL	YLDPVQRTVA	VLIVNSDKEG	TGEKEKVEEN	SDWAVYFNEK
H38	ATDED...EEE	ELEPVRSAL	VLQFMIDKEG	NGENE.STGN	IGWSIYYDNH
P20	ATDTD...EDE	ELESVRSAL	VLQFMIDKEG	NGEIESTGDI	GWSIYYDDHN
Z2491	ATDED...EEE	ELESVQR.SV	VGSIQASMEG	SVELET...I	SLSMTNDSKE
H41	ATDED...EEE	ELESVQR.SV	VGSIQASMEG	SVELET...I	SLSMTNDSKE
Consenso	<u>-----L--V-R---</u>	<u>-----V-----EG</u>	<u>-----E-E-----</u>		

V1

	101				150
EG327	GVLTAGTITL	KAGDNLKIKQ	NTNENTNASS	...FTYSLK	KDLTDLTSVG
BZ198	RVLKAGAITL	KAGDNLKIKQ	NTNENTNDSS	...FTYSLK	KDLTDLTSVE
BZ10	RVLKAGAITL	KAGDNLKIKQ	NTNENTNENT	NDSSFYSLK	KDLTDLTSVE
H15	RVLKAGAITL	KAGDNLKIKQ	NTNENTNENT	NDSSFYSLK	KDLTDLTSVE
EG329	GVLTAAREITL	KAGDNLKIKQ	NG...TN...	...FTYSLK	KDLTDLTSVG
PMC21	GVLTAAREITL	KAGDNLKIKQ	NG...TN...	...FTYSLK	KDLTDLTSVG
H38	NTLHGATVTL	KAGDNLKIKQ	NTNKNNTNENT	NDSSFYSLK	KDLTDLTSVE
P20	TLHG.ATVTL	KAGDNLKIKQ	SGKD.....	...FTYSLK	KELKDLTSVE
Z2491	FVDPYIVVTL	KAGDNLKIKQ	NTNENTNASS	...FTYSLK	KDLTGLINVE
H41	FVDPYIVVTL	KAGDNLKIKQ	NTNENTNASS	...FTYSLK	KDLTGLINVE
Consenso	<u>-----TL</u>	<u>KAGDNLKIKQ</u>	<u>-----FTYSLK</u>	<u>-----K-L--L--V-</u>	

V1

C2

V2

C3

	151				200
EG327	TEKLSFSANS	NKVNITSDTK	GLNFAKKTAE	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
BZ198	TEKLSFGANG	NKVNITSDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
BZ10	TEKLSFGANG	NKVNITSDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
H15	TEKLSFGANG	NKVNITSDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
EG329	TEKLSFSANG	NKVNITSDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
PMC21	TEKLSFSANG	NKVNITSDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
H38	TEKLSFGANG	NKVNITSDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
P20	TEKLSFGANG	NKVNITSDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
Z2491	TEKLSFGANG	KKVNIIISDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDTL
H41	TEKLSFGANG	KKVNIIISDTK	GLNFAKETAG	TNGDPTVHLN	GIGSTLTDML
Consenso	<u>TEKLSF-AN-</u>	<u>-KVNI-SDTK</u>	<u>GLNFAK-TA-</u>	<u>TNGD-TVHLN</u>	<u>GIGSTLTD-L</u>

C3

FIG. 1

ES 2 389 719 T3

	201				250
EG327	LNTGATTNVT	NDNVTDDEKK	RAASVKDVLN	AGWNIKGVKP	GTTAS..DNV
BZ198	LNTGATTNVT	NDNVTDDEKK	RAASVKDVLN	AGWNIKGVKP	GTTAS..DNV
BZ10	LNTGATTNVT	NDNVTDDEKK	RAASVKDVLN	AGWNIKGVKP	GTTAS..DNV
H15	LNTGATTNVT	NDNVTDDEKK	RAASVKDVLN	AGWNIKGVKP	GTTAS..DNV
EG329	LNTGATTNVT	NDNVTDDEKK	RAASVKDVLN	AGWNIKGVKP	GTTAS..DNV
PMC21	LNTGATTNVT	NDNVTDDEKK	RAASVKDVLN	AGWNIKGVKP	GTTAS..DNV
H38	LNTGATTNVT	NDNVTDDKKK	RAASVKDVLN	AGWNIKGVKP	GTTAS..DNV
P20	AGSSASHVDA	GNQST..HYT	RAASIKDVLN	AGWNIKGVKT	GSTTGQSENV
Z2491	AGSSASHVDA	GNQST..HYT	RAASIKDVLN	AGWNIKGVKT	GSTTGQSENV
H41	LNTGATTNVT	NDNVTDDEKK	RAASVKDVLN	AGWNIKGVKP	GTTAS..DNV
Consenso	<u>---A-----</u>	<u>----T-----</u>	<u>RAAS-KDVLN</u>	<u>AGWNIKGVK-</u>	<u>G-T-----NV</u>
	V3		C4		V4

	251				300
EG327	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	RTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
BZ198	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	KTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
BZ10	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	RTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
H15	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	KTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
EG329	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	KTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
PMC21	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	KTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
H38	DFVHTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	RTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
P20	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	RTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
Z2491	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	RTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
H41	DFVRTYDTVE	FLSADTKTTT	VNVESKDNGK	KTEVKIGAKT	SVIKEKDGKL
Consenso	<u>DFV-TYDTVE</u>	<u>FLSADTKTTT</u>	<u>VNVESKDNGK</u>	<u>-TEVKIGAKT</u>	<u>SVIKEKDGKL</u>
			C5		

	301				350
EG327	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
BZ198	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
BZ10	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
H15	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
EG329	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
PMC21	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
H38	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
P20	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
Z2491	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
H41	VTGKDKGEND	SSTDGEGGLV	TAKEVIDAVN	KAGWRMKT TT	ANGQTGQADK
Consenso	<u>VTGK-K-EN-</u>	<u>SSTD-GEGLV</u>	<u>TAKEVIDAVN</u>	<u>KAGWRMKT TT</u>	<u>ANGQTGQADK</u>
			C5		

	351				400
EG327	FETVTSGTNV	TFASGKGTTA	TVSKDDQGNI	TVMYDVNVGD	ALNVNQLQNS
BZ198	FETVTSGTNV	TFASGKGTTA	TVSKDDQGNI	TVKYDVNVGD	ALNVNQLQNS
BZ10	FETVTSGTKV	TFASGNGTTA	TVSKDDQGNI	TVKYDVNVGD	ALNVNQLQNS
H15	FETVTSGTKV	TFASGNGTTA	TVSKDDQGNI	TVKYDVNVGD	ALNVNQLQNS
EG329	FETVTSGTNV	TFASGKGTTA	TVSKDDQGNI	TVMYDVNVGD	ALNVNQLQNS
PMC21	FETVTSGTNV	TFASGKGTTA	TVSKDDQGNI	TVMYDVNVGD	ALNVNQLQNS
H38	FETVTSGTNV	TFASGKGTTA	TVSKDDQGNI	TVKYDVNVGD	ALNVNQLQNS
P20	FETVTSGTKV	TFASGNGTTA	TVSKDDQGNI	TVKYDVNVGD	ALNVNQLQNS
Z2491	FETVTSGTNV	TFASGKGTTA	TVSKDDQGNI	TVMYDVNVGD	ALNVNQLQNS-
H41	FETVTSGTKV	TFASGNGTTA	TVSKDDQGNI	TVKYDVNVGD	ALNVNQLQNS
Consenso	<u>FETVTSGT-V</u>	<u>TFASG-GTTA</u>	<u>TVSKDDQGNI</u>	<u>TV-YDVNVGD</u>	<u>ALNVNQLQNS</u>
			C5		

FIG. 1 cont.

ES 2 389 719 T3

	401				450
EG327	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
BZ198	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
BZ10	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
H15	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
EG329	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
PMC21	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
H38	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
P20	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
Z2491	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EISRNGKNID
H41	GWNLDSKAVA	GSSGKVISGN	VSPSKGKMDE	TVNINAGNNI	EITRNGKNID
Consenso	<u>GWNLDSKAVA</u>	<u>GSSGKVISGN</u>	<u>VSPSKGKMDE</u>	<u>TVNINAGNNI</u>	<u>EI-RNGKNID</u>

C5

	451				500
EG327	IATSMTPOFS	SVSLGAGADA	PTLSVDDEGA	LNVGSKDANK	PVRITNVAPG
BZ198	IATSMAPQFS	SVSLGAGADA	PTLSVDDEGA	LNVGSKDTNK	PVRITNVAPG
BZ10	IATSMTPOFS	SVSLGAGADA	PTLSVDDEGA	LNVGSKDANK	PVRITNVAPG
H15	IATSMTPOFS	SVSLGAGADA	PTLSVDDEGA	LNVGSKDANK	PVRITNVAPG
EG329	IATSMTPOFS	SVSLGAGADA	PTLSVDG.DA	LNVGSKKDNK	PVRITNVAPG
PMC21	IATSMTPOFS	SVSLGAGADA	PTLSVDG.DA	LNVGSKKDNK	PVRITNVAPG
H38	IATSMTPOFS	SVSLGAGADA	PTLSVDDKGA	LNVGSKDANK	PVRITNVAPG
P20	IATSMTPOFS	SVSLGAGADA	PTLSVDDEGA	LNVGSKDANK	PVRITNVAPG
Z2491	IATSMAPQFS	SVSLGAGADA	PTLSVDDEGA	LNVGSKDANK	PVRITNVAPG
H41	IATSMTPOFS	SVSLGAGADA	PTLSVDDEGA	LNVGSKDANK	PVRITNVAPG
Consenso	<u>IATSM-POFS</u>	<u>SVSLGAGADA</u>	<u>PTLSVD---A</u>	<u>LNVGSK--NK</u>	<u>PVRITNVAPG</u>

C5

	501				550
EG327	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVDGNA	RAGIAQAIAT	AGLVQAYLPG
BZ198	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVDGNA	RAGIAQAIAT	AGLVQAYLPG
BZ10	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVDGNA	RAGIAQAIAT	AGLAQAYLPG
H15	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVDGNA	RAGIAQAIAT	AGLVQAYLPG
EG329	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVDGNA	RAGIAQAIAT	AGLVQAYLPG
PMC21	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVDGNA	RAGIAQAIAT	AGLVQAYLPG
H38	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVDGNA	RAGIAQAIAT	AGLVQAYLPG
P20	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVNGNA	RAGIAQAIAT	AGLAQAYLPG
Z2491	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVDGNA	RAGIAQAIAT	AGLVQAYLPG
H41	VKEGDVTNVA	QLKGVAQNLN	NRIDNVNGNA	RAGIAQAIAT	AGLVQAYLPG
Consenso	<u>VKEGDVTNVA</u>	<u>QLKGVAQNLN</u>	<u>N-IDNV-GNA</u>	<u>RAGIAQAIAT</u>	<u>AGL-QAYLPG</u>

C5

	551				600
EG327	KSMMAIGGGT	YRGEAGYAIG	YSSISDGGNW	IIKGTASGNS	RGHFGASASV
BZ198	KSMMAIGGDT	YRGEAGYAIG	YSSISDGGNW	IIKGTASGNS	RGHFGASASV
BZ10	KSMMAIGGGT	YRGEAGYAIG	YSSISDTGNW	VIKGTASGNS	RGHFGTSASV
H15	KSMMAIGGGT	YRGEAGYAIG	YSSISDTGNW	VIKGTASGNS	RGHFGASASV
EG329	KSMMAIGGGT	YRGEAGYAIG	YSSISDGGNW	IIKGTASGNS	RGHFGASASV
PMC21	KSMMAIGGGT	YRGEAGYAIG	YSSISDGGNW	IIKGTASGNS	RGHFGASASV
H38	KSMMAIGGGT	YRGEAGYAIG	YSSISDGGNW	IIKGTASGNS	RGHFGASASV
P20	KSMMAIGGGT	YLGEAGYAIG	YSSISDTGNW	VIKGTASGNS	RGHFGTSASV
Z2491	KSMMAIGGGT	YRGEAGYAIG	YSSISDGGNW	IIKGTASGNS	RGHFGASASV
H41	KSMMAIGGGT	YLGEAGYAIG	YSSISAGGNW	IIKGTASGNS	RGHFGASASV
Consenso	<u>KSMMAIGG-T</u>	<u>Y-GEAGYAIG</u>	<u>YSSIS--GNW</u>	<u>-IKGTASGNS</u>	<u>RGHFG-SASV</u>

C5

FIG. 1 cont.

	601
EG327	GYQW.
BZ198	GYQW.
BZ10	GYQW.
H15	GYQW.
EG329	GYQW.
PMC21	GYQW.
H38	GYQW.
P20	GYQW.
Z2491	GYQW.
H41	GYQW.
Consenso	<u>GYQW.</u>
	C5

FIG. 1 cont.

	1								70
H15	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
BZ10	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
BZ198	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
P20	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
H38	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
Z2491	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
H41	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
EG329	ATGAACGAAA	TATTGCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
PMC21	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
EG327	ATGAACAAAA	TATACCGCAT	CATTTGGAAT	AGTGCCCTCA	ATGCCCTGGGT	CGTCGTATCC			GAGCTCACAC
Consenso	<u>ATGAAC-AAA</u>	<u>TAT--CGCAT</u>	<u>CATTTGGAAT</u>	<u>AG-GCCCTCA</u>	<u>ATGC-TGGGT</u>	<u>-G--GTATCC</u>			<u>GAGCTCACAC</u>

C1

	71								140
H15	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
BZ10	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
BZ198	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
P20	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
H38	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
Z2491	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
H41	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
EG329	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
PMC21	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
EG327	GCAACCACAC	CAAACGCGCC	TCCGCAACCG	TGGCGACCGC	CGTATTGGCG	ACACTGTTGT			TTGCAACGGT
Consenso	<u>GCAACCACAC</u>	<u>CAAACGCGCC</u>	<u>TCCGCAACCG</u>	<u>TG--GACCGC</u>	<u>CGTATTGGCG</u>	<u>AC-CTG-TGT</u>			<u>--GCAACGGT</u>

C1

	141								210
H15	TCAGGCCGAAT	GCTACCGATG	ACGAC.....GATTTA	TATTTAGAAC	CCGTACAACG			CACTGCTGTC
BZ10	TCAGGCCGAAT	GCTACCGATG	ACGAC.....GATTTA	TATTTAGAAC	CCGTACAACG			CACTGCTGTC
BZ198	TCAGGCCGAAT	GCTACCGATG	ACGAC.....GATTTA	TATTTAGAAC	CCGTACAACG			CACTGCTGTC
P20	TCAGGCCGAAT	GCTACCGATA	CCGAT.....	.GAAGATGAA	GAGTTAGAAT	CCGTAGCACG			CTCTGCTCTG
H38	TCAGGCCGAAT	GCTACCGATG	AAGAT.....	.GAAGAAGAA	GAGTTAGAAC	CCGTAGTACG			CTCTGCTCTG
Z2491	TCAGGCCGAAT	GCTACCGATG	AAGAT.....	.GAAGAAGAA	GAGTTAGAAT	CCGTACAACG			CTCTGCTCTG
H41	TCAGGCCGAAT	GCTACCGATG	AAGAT.....	.GAAGAAGAA	GAGTTAGAAT	CCGTACAACG			CTCTG...TC
EG329	TCAGGCCAAGT	GCTAACCAATG	AAGAGCAAGA	AGAAGATTTA	TATTTAGACC	CCGTGCTACG			CACTGTTGCC
PMC21	TCAGGCCAAGT	GCTAACCAATG	AAGAGCAAGA	AGAAGATTTA	TATTTAGACC	CCGTGCTACG			CACTGTTGCC
EG327	TCAGGCCGAGT	ACTACCGATG	ACGAC.....GATTTA	TATTTAGAAC	CCGTACAACG			CACTGCTGTC
Consenso	<u>TCAGGC-A-T</u>	<u>-CTA-C-AT-</u>	<u>--GA-----</u>	<u>----GA---A</u>	<u>-A-TTAGA--</u>	<u>CCGT---ACG</u>			<u>C-CTG-----</u>

C1

V1

	211								280
H15	GTGTTGAGCT	TCCGTTCCGA	TAAAGAAGGC	ACGGGAGAAA	AAGAAGGTAC	AGAAGA...T			TCAAATTGGG
BZ10	GTGTTGAGCT	TCCGTTCCGA	TAAAGAAGGC	ACGGGAGAAA	AAGAAGGTAC	AGAAGA...T			TCAAATTGGG
BZ198	GTGTTGAGCT	TCCGTTCCGA	TAAAGAAGGC	ACGGGAGAAA	AAGAAGGTAC	AGAAGA...T			TCAAATTGGG
P20	GTGTTGCAAT	TCATGATCGA	TAAAGAAGGC	AATGGAGAAA	TCGAATCTAC	AGGAGA...T			ATAGGTTGGA
H38	GTGTTGCAAT	TCATGATCGA	TAAAGAAGGC	AATGGAGAAA	TCGAATCTAC	AGGAGA...T			ATAGGTTGGA
Z2491	GGG...AGCAT	TCAAG...CCAG	TATGGAAGGC	AGCGGCGAAT	TGGAACCGAT	ATCAT...T			ATCAATGACT
H41	GTAGGGAGCA	TTCARCCAG	TATGGAAGGC	AGCGTCGAAT	TGGAACCGAT	A.....T			TCATTATCAA
EG329	GTGTTGATAG	TCAATTCCGA	TAAAGAAGGC	ACGGGAGAAA	AAGAAAAGT	AGAAGAAAAT			TCAGATTGGG
PMC21	GTGTTGATAG	TCAATTCCGA	TAAAGAAGGC	ACGGGAGAAA	AAGAAAAGT	AGAAGAAAAT			TCAGATTGGG
EG327	GTGTTGAGCT	TCCGTTCCGA	TAAAGAAGGC	ACGGGAGAAA	AAGAAGTTAC	AGAAGA...T			TCAAATTGGG
Consenso	<u>G-----T</u>	<u>T-----C--</u>	<u>TA--GAAGGC</u>	<u>A--G--GAA-</u>	<u>--GAA-----</u>	<u>A-----</u>			<u>-----</u>

V1

FIG. 2

281 350
H15 CAGTATATTT CGACGAGAAA AGAGTACTAA AAGCCGGAGC AATCACCCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
B210 CAGTATATTT CGACGAGAAA AGAGTACTAA AAGCCGGAGC AATCACCCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
BZ198 CAGTATATTT CGACGAGAAA AGAGTACTAA AAGCCGGAGC AATCACCCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
P20 GTATATATTA CGACGATCAC AACACTCTAC ACGGGCGAAC CGTTACCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
H38 GTATATATTA CGACAATCAC AACACTCTAC ACGGGCGAAC CGTTACCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
Z2491 AACGACAGCA AGGAATTTGT AGACCATAC ATAGTA... .GTTACCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
H41 TGACTAACGA CAGCAAGGAA TTTGTAGACC CATAATAGT AGTTACCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
EG329 CAGTATATTT CAACGAGAAA GGAGTACTAA CAGCCAGAGA AATCACCCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
PMC21 CAGTATATTT CAACGAGAAA GGAGTACTAA CAGCCAGAGA AATCACCCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
EG327 GAGTATATTT CGACAAGAAA GGAGTACTAA CAGCCGGAAC AATCACCCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA
Consenso -----A----- -----T-ACCCTC AAAGCCGGCG ACAACCTGAA

V1 C2

351 420
H15 AATCAAACAA AACACCAATG AAAACACCAA TGA AACACC AATGACAGTA GCTTCACCTA CTCCTGAAA
B210 AATCAAACAA AACACCAATG AAAACACCAA TGA AACACC AATGACAGTA GCTTCACCTA CTCCTGAAA
BZ198 AATCAAACAA AACACCAATG AAAACACC... .AATGACAGTA GCTTCACCTA CTCCTGAAA
P20 AATCAAACAA AGCGGCAAG A... .GTTACCCTC CTCACCTA CTCGCTGAAA
H38 AATCAAACAA AACACCAATA AAAACACCAA TGA AACACC AATGACAGTA GCTTCACCTA CTCGCTGAAA
Z2491 AATCAAACAA AACACCAATG AAAACACC... .AATGCCAGTA GCTTCACCTA CTCGCTGAAA
H41 AATCAAACAA AACACCAATG AAAACACC... .AATGCCAGTA GCTTCACCTA CTCGCTGAAA
EG329 AATCAAACAA AAC... .G... .GCACAA ACTTCACCTA CTCGCTGAAA
PMC21 AATCAAACAA AAC... .G... .GCACAA ACTTCACCTA CTCGCTGAAA
EG327 AATCAAACAA AACACCAATG AAAACACC... .AATGCCAGTA GCTTCACCTA CTCGCTGAAA
Consenso AATCAAACAA A-C----- -----T-ACCCTC CTC-CTGAAA

C2 V2 C3

421 490
H15 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
B210 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
BZ198 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
P20 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
H38 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
Z2491 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
H41 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
EG329 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
PMC21 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
EG327 AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGAA ACTGAAAAAT TATCGTTTGG CGCAAACGGT AATAAAGTCA
Consenso AAAGA-CT-A -AG--CTGA- CA-TGTTG-A ACTGAAAAAT TATCGTTT-G CGCAAAC-G- AA-AAAGTCA

C3

491 560
H15 ACATCACAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
B210 ACATCACAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
BZ198 ACATCACAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
P20 ACATCACAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
H38 ACATCACAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
Z2491 ACATCATAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
H41 ACATCATAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
EG329 ACATCACAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
PMC21 ACATCACAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
EG327 ACATCACAAG CGACACCAA GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACCCCACGGT
Consenso ACATCA-AAG CGACACCAA GGCTTGAATT T-GCGAAA-A AACGGCTG-G AC-AACGGCG AC-CCACGGT

C3

561 630
H15 TCATCTGAAC GGTATCGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTG CTGAATACCG GAGCGACCAC AAACGTAACC
B210 TCATCTGAAC GGTATCGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTG CTGAATACCG GAGCGACCAC AAACGTAACC
BZ198 TCATCTGAAC GGTATCGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTG CTGAATACCG GAGCGACCAC AAACGTAACC
P20 TCATCTGAAC GGTATCGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTT GCGGGTTCTT CTGCTTCTCA CGTTGATGGG
H38 TCATCTGAAC GGTATTGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTG CTGAATACCG GAGCGACCAC AAACGTAACC
Z2491 TCATCTGAAC GGTATCGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTT GCGGGTTCTT CTGCTTCTCA CGTTGATGGG
H41 TCATCTGAAC GGTATCGGTT CGACTTTGAC CGATATGCTG CTGAATACCG GAGCGACCAC AAACGTAACC
EG329 TCATCTGAAC GGTATTGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTG CTGAATACCG GAGCGACCAC AAACGTAACC
PMC21 TCATCTGAAC GGTATTGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTG CTGAATACCG GAGCGACCAC AAACGTAACC
EG327 TCATCTGAAC GGTATCGGTT CGACTTTGAC CGATACGCTG CTGAATACCG GAGCGACCAC AAACGTAACC
Consenso TCATCTGAAC GGTAT-GGTT CGACTTTGAC CGATA-GCT- --G--T-C-- --GC--C-- --G--C--

C3 V3

FIG. 2 cont.

631 700

H15 AACGACAACG TTACCGATGA CGAGAAAAA CGTGCGGCAA GCGTTAAAGA CGTATTAAC GCAGGCTGGA
 BZ10 AACGACAACG TTACCGATGA CGAGAAAAA CGTGCGGCAA GCGTTAAAGA CGTATTAAC GCAGGCTGGA
 BZ198 AACGACAACG TTACCGATGA CGAGAAAAA CGTGCGGCAA GCGTTAAAGA CGTATTAAC GCAGGCTGGA
 P20 GGTAAACAAA GTACACATTA C.....ACT CGTGCACCAA GTATTAAGGA TGTGTTGAAT GCGGGTTGGA
 H38 AACGACAACG TTACCGATGA CAAGAAAAA CGTGCGGCAA GCGTTAAAGA CGTATTAAC GCAGGCTGGA
 Z2491 GGTAAACAAA GTACACATTA C.....ACT CGTGCACCAA GTATTAAGGA TGTGTTGAAT GCGGGTTGGA
 H41 AACGACAACG TTACCGATGA CGAGAAAAA CGTGCGGCAA GCGTTAAAGA CGTATTAAC GCAGGCTGGA
 EG329 AACGACAACG TTACCGATGA CGAGAAAAA CGTGCGGCAA GCGTTAAAGA CGTATTAAC GCTGGCTGGA
 PMC21 AACGACAACG TTACCGATGA CGAGAAAAA CGTGCGGCAA GCGTTAAAGA CGTATTAAC GCAGGCTGGA
 EG327 AACGACAACG TTACCGATGA CGAGAAAAA CGTGCGGCAA GCGTTAAAGA CGTATTAAC GCTGGCTGGA
 Consenso ---AC-A-- -TAC--AT-A C-----A-- CGTGC-GCAA G--TTAA-GA -GT-TT-AA- GC-GG-TGGA

V3

C4

701 770

H15 ACATTAAGG CGTTAAACC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 BZ10 ACATTAAGG CGTTAAACC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 BZ198 ACATTAAGG CGTTAAACC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 P20 ATATTAAGGG TGTTAAAAC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 H38 ACATTAAGG CGTTAAACC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 Z2491 ATATTAAGGG TGTTAAAAC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 H41 ACATTAAGG CGTTAAACC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 EG329 ACATTAAGG CGTTAAACC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 PMC21 ACATTAAGG CGTTAAACC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 EG327 ACATTAAGG CGTTAAACC GGTACAACAG CT.....TC CGATAACGTT GATTCGTCC GCACTTACGA
 Consenso A-ATTAAGG -GTTAAA-C- GG--CAACA- CT-----TC -GA-AA-GT- GATTCGTCC -GACTTACGA

C4

V4

C5

771 840

H15 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 BZ10 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 BZ198 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 P20 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 H38 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 Z2491 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 H41 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 EG329 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 PMC21 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 EG327 CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG
 Consenso CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACCAACGACT GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG

C5

841 910

H15 AAAACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 BZ10 AAAACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 BZ198 AAAACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 P20 AAGACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 H38 AAGACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 Z2491 AAGACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 H41 AAAACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 EG329 AAAACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 PMC21 AAAACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 EG327 AAGACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 Consenso A-AACCGAAG TTAATAATCGG TCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA

C5

911 980

H15 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 BZ10 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 BZ198 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 P20 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 H38 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 Z2491 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 H41 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 EG329 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 PMC21 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 EG327 AAGGCAAAG CGAGAATGGT TCTTCTACG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA
 Consenso AAG-CAAAG- CGAGAATG-T TCTTCTACG AC-AAGGCGA AGGCTTAGTG ACTGCAAAG AAGTGATTGA

C5

FIG. 2 cont.

981 1050
H15 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
B210 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
BZ198 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
P20 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
H38 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
22491 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
H41 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
EG329 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
PMC21 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
EG327 TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG
Consenso TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGAA AACACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG

C5

1051 1120
H15 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
B210 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
BZ198 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
P20 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
H38 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
22491 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
H41 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
EG329 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
PMC21 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
EG327 TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAAAGTA ACCTTTGCTA GTGGTAATGG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA
Consenso TTTGAAACCG TTACATCAGG CACAAA-GTA ACCTTTGCTA GTGGTAA-GG TACAACCTGCG ACTGTAAGTA

C5

1121 1190
H15 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
B210 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
BZ198 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
P20 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
H38 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
22491 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
H41 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
EG329 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
PMC21 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
EG327 AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTAAGT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT
Consenso AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTA-GT ATGATGTAAA TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT

C5

1191 1260
H15 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
B210 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
BZ198 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
P20 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
H38 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
22491 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
H41 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
EG329 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
PMC21 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
EG327 GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
Consenso GCAAAACAGC GGTGGAATT TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTCCG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT

C5

1261 1330
H15 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
B210 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
BZ198 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
P20 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
H38 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
22491 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
H41 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
EG329 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
PMC21 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
EG327 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC
Consenso GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG CAACAACATC GAGATTACCC

C5

FIG. 2 cont.

1331
 H15 GCAACGGCAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAATTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 B210 GCAACGGCAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAATTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 B2198 GCAACGGTAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAGTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 P20 GCAACGGCAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAATTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 H38 GCAACGGTAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAGTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 Z2491 GCAACGGTAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAGTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 H41 GCAACGGCAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAATTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 EG329 GCAACGGTAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAGTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 PMC21 GCAACGGTAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAATTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 EG327 GCAACGGCAA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATGACCCC GCAATTTTCC AGCGTTTCGC TCGCGCGGG
 Consenso GCAACGG-AA AAATATCGAC ATCGCCACTT CGATG-C-CC GCA-TTTTCC AGCGTTTCGC TCGG-GCGGG

C5

1401
 H15 GCGGATGCG CCCACTTTAA GCGTGGATGA CGAGGGCGCG TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 B210 GCGGATGCG CCCACTTTAA GCGTGGATGA CGAGGGCGCG TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 B2198 GCGGATGCG CCCACTTTGA GCGTGGATGA CGAGGGCGCG TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 P20 GCGGATGCG CCCACTTTAA GCGTGGATGA CGAGGGCGCG TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 H38 GCGGATGCG CCCACTTTGA GCGTGGATGA CAAGGGCGCG TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 Z2491 GCGGATGCG CCCACTTTAA GCGTGGATGA CGAGGGCGCG TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 H41 GCGGATGCG CCCACTTTAA GCGTGGATGA CGAGGGCGCG TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 EG329 GCGGATGCG CCCACTTTGA GCGTGGAT... .GGGACGCA TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 PMC21 GCGGATGCG CCCACTTTGA GCGTGGAT... .GGGACGCA TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 EG327 GCGGATGCG CCCACTTTAA GCGTGGATGA CGAGGGCGCG TTGAATGTGC GCAGCAAGGA TGC CAACAAA
 Consenso GCG-GATGCG CCCACTTT-A GCGTGGAT-- ---GG-CGC- TTGAATGTGC GCAGCAAG-A ---CAACAAA

C5

1471
 H15 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 B210 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 B2198 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 P20 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 H38 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 Z2491 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 H41 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 EG329 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 PMC21 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 EG327 CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG
 Consenso CCCGTCCGCA TTACCAATGT CGCCCCGGGC GTTAAAGAGG GGGATGTTAC AAACGTCGCA CA-CTTAAAG

C5

1541
 H15 GTGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGCGGGGTA TCGCCCAAGC
 B210 GTGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGCGGGGTA TCGCCCAAGC
 B2198 GCGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGTGGGGCA TCGCCCAAGC
 P20 GTGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGCGGGGTA TCGCCCAAGC
 H38 GCGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGTGGGGCA TCGCCCAAGC
 Z2491 GCGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGTGGGGCA TCGCCCAAGC
 H41 GTGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGTGGGGCA TCGCCCAAGC
 EG329 GCGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGTGGGGCA TCGCCCAAGC
 PMC21 GCGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGTGGGGCA TCGCCCAAGC
 EG327 GCGTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CGTGGGGCA TCGCCCAAGC
 Consenso G-GTGGCGCA AAAC TTGAAC AACCGCATCG ACAATGTGGA CGGCAACGCG CG-GCGGG-A TCGCCCAAGC

C5

1611
 H15 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 B210 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 B2198 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 P20 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 H38 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 Z2491 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 H41 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 EG329 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 PMC21 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 EG327 GATTGCAACC GCAGGTTTGG CTCAGGCCTA TTTGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCGGACT
 Consenso GATTGCAACC GCAGG-T-G -TCAGGC-TA T-TGCCCGGC AAGAGTATGA TGCCGATCGG CGGCG--ACT

C5

FIG. 2 cont.

	1681						1750
H15	TATCGCGGCG	AAGCCGGTTA	CGCCATCGGC	TACTCGAGCA	TTTCTGACAC	TGGGAATTGG	GTTATCAAGG
BZ10	TATCGCGGCG	AAGCCGGTTA	CGCCATCGGC	TACTCGAGCA	TTTCTGACAC	TGGGAATTGG	GTTATCAAGG
BZ198	TATCGCGGCG	AAGCCGGTTA	CGCCATCGGC	TACTCAAGTA	TTTCCGACGG	CGGAAATTGG	ATTATCAAAG
P20	TATCTCGGCG	AAGCCGGTTA	CGCCATCGGC	TACTCGAGCA	TTTCTGACAC	TGGGAATTGG	GTTATCAAGG
H38	TATCGCGGCG	AAGCCGGTTA	CGCCATCGGC	TACTCCAGTA	TTTCCGACGG	CGGAAATTGG	ATTATCAAAG
Z2491	TATCGCGGCG	AAGCCGGTTA	CGCCATCGGC	TACTCCAGTA	TTTCCGACGG	CGGAAATTGG	ATTATCAAAG
H41	TATCTCGGCG	AAGCCGGTTA	TGCCATCGGC	TACTCAAGCA	TTTCCGCCGG	CGGAAATTGG	ATTATCAAAG
EG329	TATCGCGGCG	AAGCCGGTTA	CGCCATCGGC	TACTCCAGTA	TTTCCGACGG	CGGAAATTGG	ATTATCAAAG
PMC21	TATCGCGGCG	AAGCCGGTTA	CGCCATCGGC	TACTCCAGTA	TTTCCGACGG	CGGAAATTGG	ATTATCAAAG
EG327	TATCGCGGCG	AAGCCGGTTA	TGCCATCGGC	TACTCAAGCA	TTTCCGACGG	CGGAAATTGG	ATTATCAAAG
Consenso	<u>TATC-CGGCG</u>	<u>AAGCCGGTTA</u>	<u>-GCCATCGGC</u>	<u>TACTC-AG-A</u>	<u>TTTC-G-C--</u>	<u>-GG-AATTGG</u>	<u>-TTATCAA-G</u>

C5

	1751						1815
H15	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGCCATT	TCGGTGCTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
BZ10	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGTCATT	TCGGTACTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
BZ198	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGCCATT	TCGGTGCTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAAT	GGTAA
P20	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGTCATT	TCGGTACTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
H38	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGTCATT	TCGGTGCTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
Z2491	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGCCATT	TCGGTGCTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
H41	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGCCATT	TCGGTGCTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
EG329	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGCCATT	TCGGTGCTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
PMC21	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGCCATT	TCGGTGCTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
EG327	GCACGGCTTC	CGGCAATTCG	CGCGGCCATT	TCGGTGCTTC	CGCATCTGTC	GGTTATCAGT	GGTAA
Consenso	<u>GCACGGCTTC</u>	<u>CGGCAATTCG</u>	<u>CGCGG-CATT</u>	<u>TCGGT-CTTC</u>	<u>CGCATCTGTC</u>	<u>GGTTATCA-T</u>	<u>GGTAA</u>

C5

FIG. 2 cont.

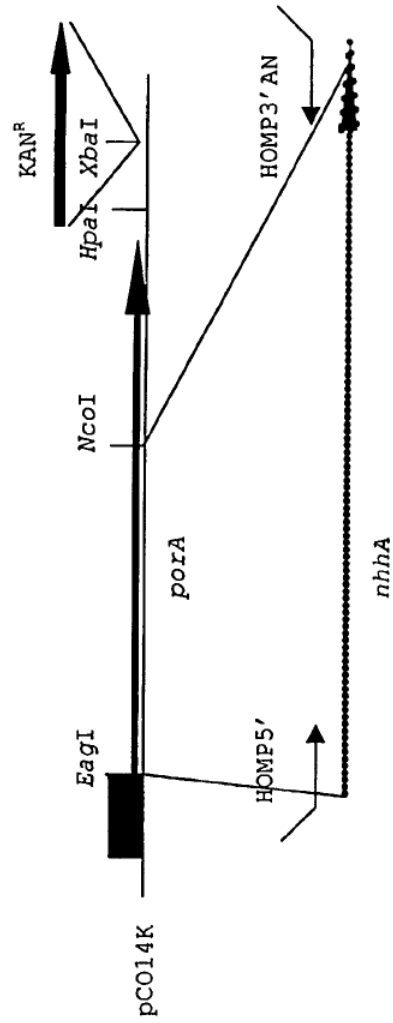


FIG. 3A

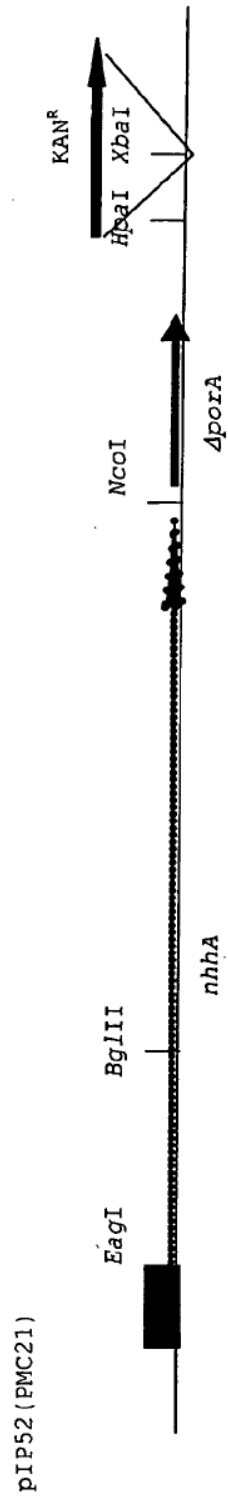


FIG. 3B

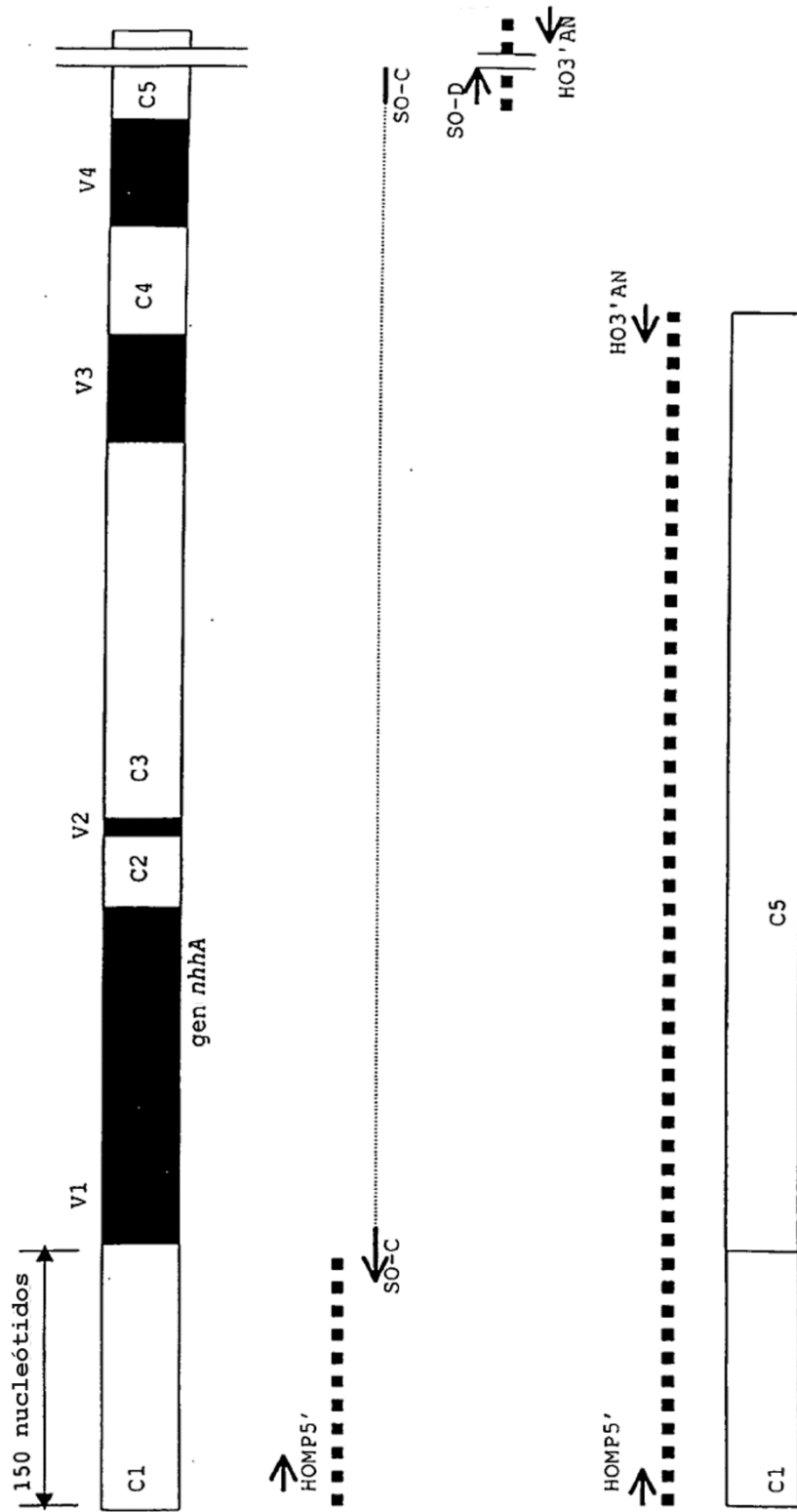


FIG. 4A

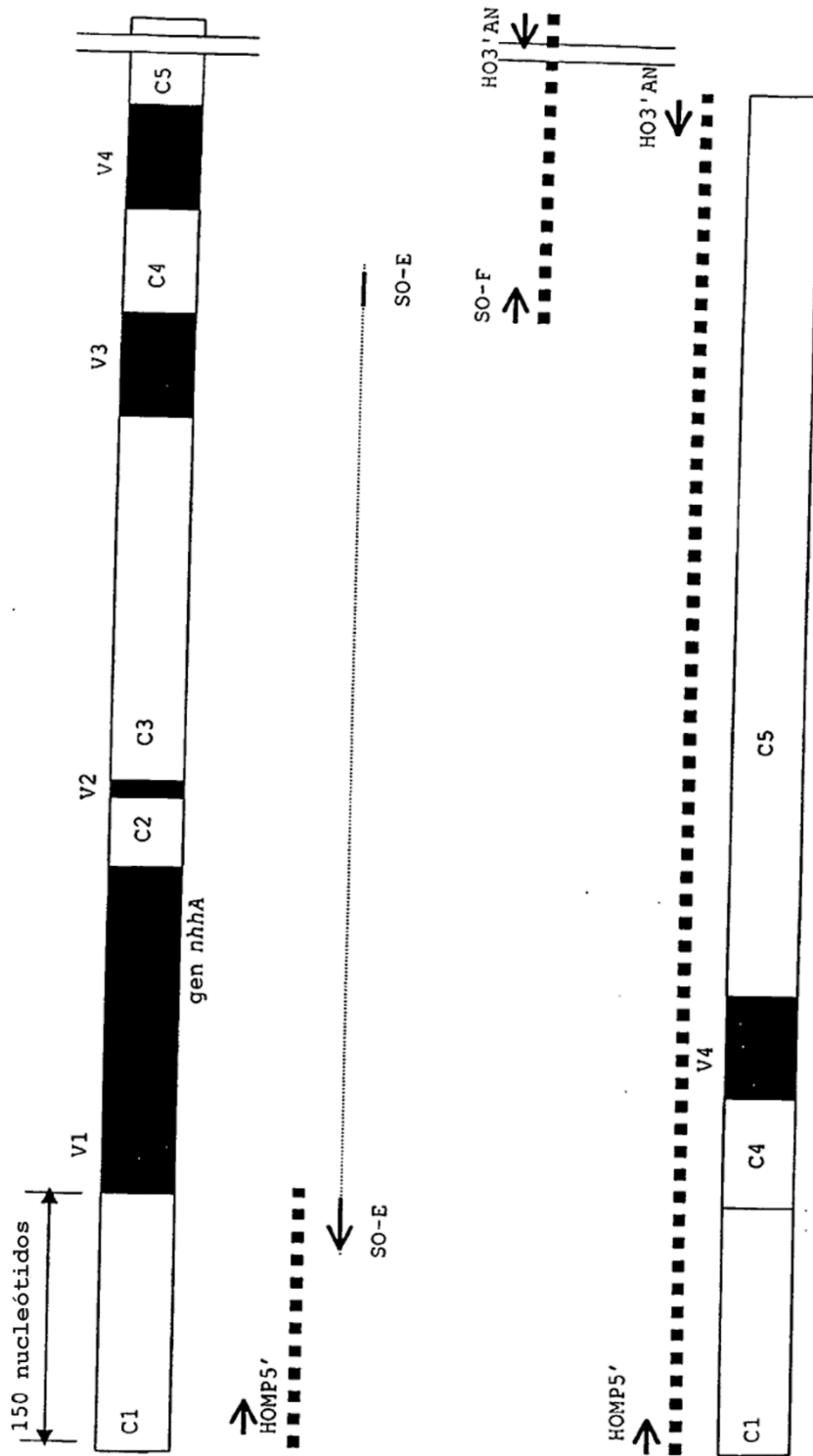


FIG. 4B

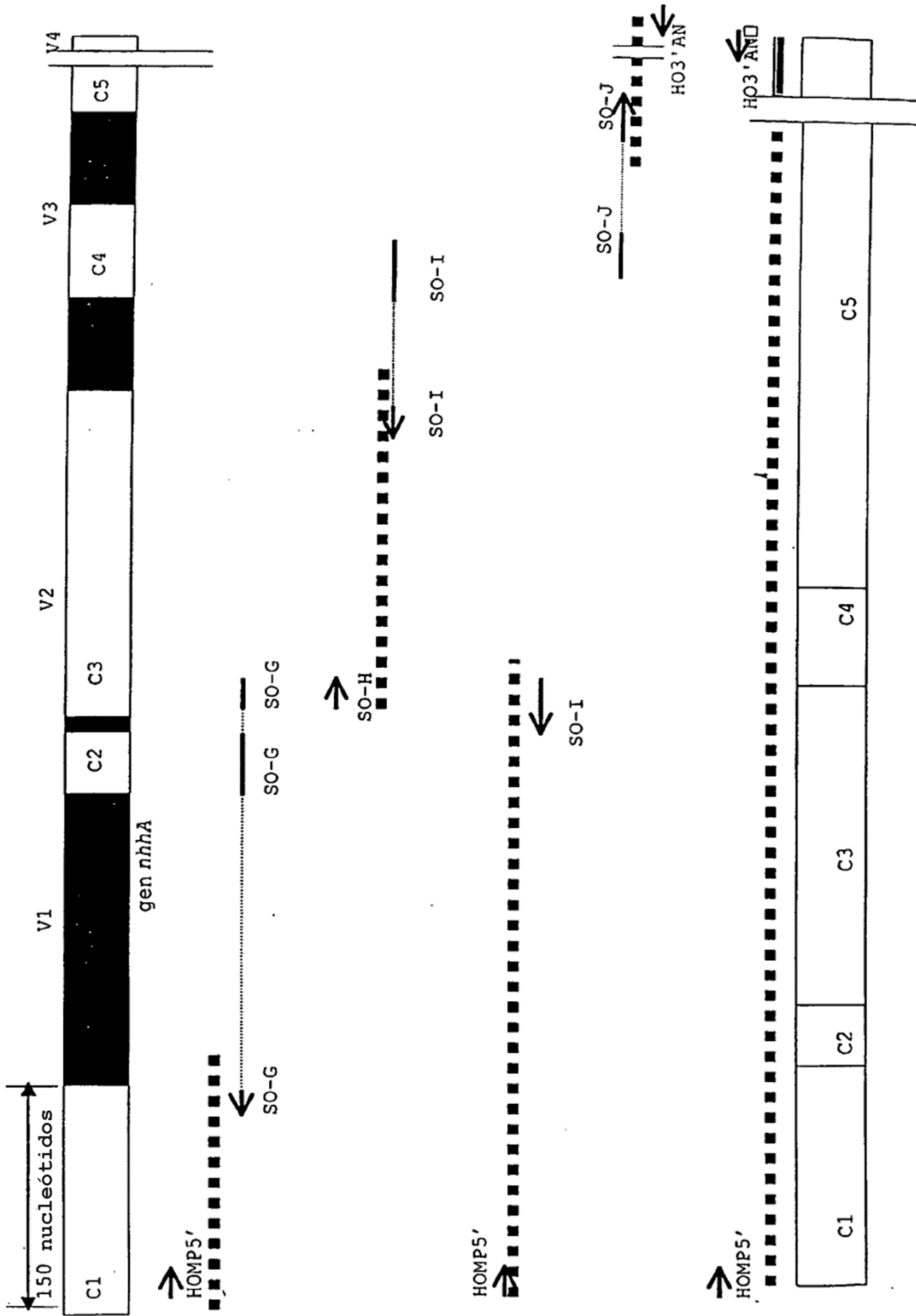


FIG. 4C

1 MNKIYRIIWN SALNAWVVVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVQAS
 51 ANNETDLTSV GTEKLSFSAN GNKVNITS DT KGLNFAKETA GTNGD TT VHL
 101 NGIGSTLTD T LLNTGATTNV TNDNVT DDEK KRAASVKDVL NAGWNIKGVK
 151 PGT TASDNVD FVRTYDTVEF LSADTKTTV NVESKDNGKK TEVKIGAKTS
 201 VIKEKDGKLV TGKDKGENGS STDEGEGLVT AKEVIDAVNK AGWRMKT TTA
 251 NGQTGQADKF ETVTSGTNVT FASGKGT TAT VSKDDQGNIT VMYDVNVGDA
 301 LNVNQLQNSG WNLDSKAVAG SSGKVISGNV SPSKGMDET VNINAGNNIE
 351 ITRNGKNIDI ATSMTPQFSS VSLGAGADAP TLSVDGDALN VGSKKDNKPV
 401 RITNVAPGVK EGDVTNVAQL KGVAQNLNNR IDNVDGNARA GIAQAIATAG
 451 LVQAYLPGKS MMAIGGGTYR GEAGYAIGYS SISDGGNWII KGTASGNSRG
 501 HFGASASVGY QW*

A

1 ATGAACAAAA TATACCGCAT CATT TGG AAT AGTGCCCTCA ATGCATGGGT
 51 CGTCGTATCC GAGCTCACAC GCAACCACAC CAAACGCGCC TCCGCAACCG
 101 TGAAGACCGC CGTATTGGCG ACTCTGTTGT TTGCAACGGT TCAGGCAAGT
 151 GCTAACAA TG AACAGATCT GACCAGTGT GGA ACTGAAA AATTATCGTT
 201 TAGCGCAAAC GGCAATAAAG TCAACATCAC AAGCGACACC AAAGGCTTGA
 251 ATTTTGC GAA AGAAACGGCT GGGACGAACG GCGACACCAC GGTTCATCTG
 301 AACGGTAT TG GTCGACTTT GACCGATACG CTGCTGAATA CCGGAGCGAC
 351 CACAAACGTA ACCAACGACA AC GTTACCGA TGACGAGAAA AAACGTGCGG
 401 CAAGCGTTAA AGACGTATTA AACGCTGGCT GGAACATTAA AGGCGTTAAA
 451 CCCGGTACAA CAGCTTCCGA TAACGTTGAT TTCGTCCGCA CTTACGACAC
 501 AGTCGAGTTC TTGAGCGCAG ATACGAAAAC AACGACTGTT AATGTGGAAA
 551 GCAAAGACAA CGGCAAGAAA ACCGAAGTTA AAATCGGTGC GAAGACTTCT
 601 GTTATTA AAG AAAAAGACGG TAAGTTGGTT ACTGGTAAAG ACAAAGCGA
 651 GAATGGTTCT TCTACAGACG AAGCGAAGG CTTAGTGACT GCAAAGAAG
 701 TGATTGATGC AGTAAACAAG GCTGGTTGGA GAATGAAAAC AAC AACC GCT
 751 AATGGTCAAA CAGGTCAAGC TGACAAGTTT GAAACCGTTA CATCAGGCAC
 801 AAATGTAACC TTTGCTAGTG GTAAAGGTAC AACTGCGACT GTAAGTAAAG
 851 ATGATCAAGG CAACATCACT GTTATGTATG ATGTAAATGT CGGCGATGCC
 901 CTAAACGTCA ATCAGCTGCA AAACAGCGGT TGGAATTTGG ATTCCAAAGC
 951 GGTTCAGGT TCTTCGGGCA AAGTCATCAG CGGCAATGTT TCGCCGAGCA
 1001 AGGGAAAGAT GGATGAAACC GTC AACATTA ATGCCGGCAA CAACATCGAG
 1051 ATTACCCGCA ACGGTAAAA TATCGACATC GCCACTTCGA TGACCCGCA
 1101 GTTTCCAGC GTTTCGCTCG GCGCGGGGGC GGATGCGCCC ACTTTGAGCG
 1151 TGGATGGGGA CGCATTGAAT GTCGGCAGCA AGAAGGACAA CAAACCCGTC
 1201 CGCATTACCA ATGTCGCCCC GGGCGTTAAA GAGGGGGATG TTACAAACGT
 1251 CGCACAACTT AAAGGCGTGG CGCAAACTT GAACAACCGC ATCGACAATG
 1301 TGGACGGCAA CGCGCTGCG GGCATCGCCC AAGCGATTGC AACCGCAGGT
 1351 CTGGTTCAGG CGTATTTGCC CGGCAAGAGT ATGATGGCGA TCGGCGGGCG
 1401 CACTTATCGC GGC GAAGCCG GTTACGCCAT CGGCTACTCC AGTATTTCCG
 1451 ACGGCGGAAA TTGGATTATC AAAGGCACGG CTTCCGGCAA TTCGCGGGC
 1501 CATTTCGGTG CTTCCGCATC TGTCGGTTAT CAGTGGTAA

B

FIG. 5

1 MNKIYRIIWN SALNAWVAVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVQAN
 51 ATDETGLINV ETEKLSFGAN GKKVNIISDT KGLNFAKETA GTNGDTTVHL
 101 NGIGSTLTDL LLNTGATTNV TNDNVTDDEK KRAASVKDVL NAGWNIKGVK
 151 PGTTASDNVD FVRTYDTVEF LSADTKTTTV NVESKDNGKK TEVKIGAKTS
 201 VIKEKDGKLV TGKKGGENGS STDEEGLVT AKEVIDAVNK AGWRMKTSTA
 251 NGQTGQADKF ETVTSGTKVT FASNGTAT VSKDDQGNIT VKYDVNVGDA
 301 LNVNQLQNSG WNLDSKAVAG SSGKVISGNV SPSKGMDET VNINAGNIE
 351 ITRNGKNIDI ATSMTPQFSS VSLGAGADAP TLSVDDEGAL NVGSKDANKP
 401 VRITNVAPGV KEGDVTNVAQ LKGVAQNLNN RIDNVNGNAR AGIAQAIATA
 451 GLVQAYLPGK SMMAIGGGTY LGEAGYAIGY SSISAGGNWI IKGTASGNSR
 501 GHFGASASVG YQW*

A

1 ATGAACAAAA TATACCGCAT CATTGGGAAT AGTGCCCTCA ATGCCTGGGT
 51 CGCCGTATCC GAGCTCACAC GCAACCACAC CAAACGCGCC TCCGCAACCG
 101 TGAAGACCGC CGTATTGGCG AACTGTGT TTGCAACGGT TCAGGCGAAT
 151 GCTACCGATG AACAGGCCT GATCAATGTT GAAACTGAAA AATTATCGTT
 201 TGGCGCAAAC GGCAAGAAAG TCAACATCAT AAGCGACACC AAAGGCTTGA
 251 ATTTTCGCGAA AGAAACGGCT GGGACGAACG GCGACACCAC GGTTCATCTG
 301 AACGGTATCG GTTCGACTTT GACCGATATG CTGCTGAATA CCGGAGCGAC
 351 CACAAACGTA ACCAACGACA ACGTACCAGA TGACGAGAAA AAACGTGCGG
 401 CAAGCGTTAA AGACGTATTA AACGCAGGCT GGAACATTAA AGGCGTTAAA
 451 CCCGGTACAA CAGCTCCGA TAACGTTGAT TTCGTCCGCA CTTACGACAC
 501 AGTCGAGTTC TTGAGCGCAG ATACGAAAAC AACGACTGTT AATGTGAAAA
 551 GCAAAGACAA CGGCAAGAAA ACCGAAGTTA AAATCGGTGC GAAGACTTCT
 601 GTTATTTAAA AAAAAACGGT TAAGTTGGTT ACTGGTAAA GCAAAGGCGA
 651 GAATGGTTCT TCTACAGACG AAGGCGAAG CTTAGTGACT GCAAAGAAG
 701 TGATTGATGC AGTAAACAAG GCTGGTTGGA GAATGAAAAC AACCAACCGT
 751 AATGGTCAA CAGGTCAAGC TGACAAGTTT GAAACCGTTA CATCAGGCAC
 801 AAAAGTAACC TTTGCTAGTG GTAATGGTAC AACTGCGACT GTAAGTAAAG
 851 ATGATCAAGG CAACATCACT GTTAAGTATG ATGTAATGT CGGCGATGCC
 901 CTAAACGTCA ATCAGCTGCA AACAGCGGT TGGAAATTTGG ATTCCAAAGC
 951 GGTTGCAGGT TCTTCGGGCA AAGTCATCAG CGGCAATGTT TCGCCGAGCA
 1001 AGGGAAAGAT GGATGAAACC GTCAACATTA ATGCCGGCAA CAACATCGAG
 1051 ATTACCCGCA ACGGCAAAAA TATCGACATC GCCACTTCGA TGACCCCGCA
 1101 ATTTCCAGC GTTTCGCTCG GCGCGGGGC GGATGCGCC ACTTTAAGCG
 1151 TGGATGACGA GGGCGGTTG AATGTCGGCA GCAAGGATGC CAACAAACCC
 1201 GTCCGCATTA CCAATGTCGC CCCGGGCGTT AAAGAGGGGG ATGTTACAAA
 1251 CGTCGCGCAA CTTAAAGGTG TGGCGAAAA CTTGAACAAC CGCATCGACA
 1301 ATGTGAACGG CAACGCGCGT GCGGGCATCG CCCAAGCGAT TGCAACCGCA
 1351 GGTCTGGTTC AGGCGTATCT GCCCGCAAG AGTATGATGG CGATCGGCGG
 1401 CGGCACTTAT CTCGGCGAAG CCGGTTATGC CATCGGCTAC TCAAGCATTT
 1451 CCGCCGGCGG AAATTGGATT ATCAAAGCA CGGCTTCCGG CAATTCCGCG
 1501 GGCCATTTCC GTGCTTCCGC ATCTGTCCGT TATCAGTGGT AA

B

FIG. 6

1 MNKIYRI IWN SALNAWVVVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVQAS
 51 ANNVDVFR TY DTVEFLSADT KTTTVNVESK DNGKKTEVKI GAKTSVIKEK
 101 DGKLVGTGKDK GENGSSTDEG EGLVTAKEVI DAVNKAGWRM KTTTANGQTG
 151 QADKFETVTS GTNVTFASGK GTTATVSKDD QGNITVMYDV NVGDALNVNQ
 201 LQNSGWNLDS KAVAGSSGKV ISGNVSPSKG KMDET VNINA GNNIEITRNG
 251 KNIDIATSMT PQFSSVSLGA GADAP TLSVD GDALNVGSKK DNKPV RITNV
 301 APGVKEGDVT NVAQLKGVAQ NLN NRIDNVD GNARAGIAQA IATAGLVQAY
 351 LPGKSMMAIG GGT YRGEAGY AIGYSSISDG GNWIIKGTAS GNSRGHFGAS
 401 ASVGYQW*

A

1 ATGAACAAAA TATACCGCAT CATTGGAAT AGTGCCCTCA ATGCATGGGT
 51 CGTCGTATCC GAGCTCACAC GCAACCACAC CAAACGCGCC TCCGCAACCG
 101 TGAAGACCGC CGTATTGGCG ACTCTGTTGT TTGCAACGGT TCAGGCAAGT
 151 GCTAACACCG TTGATTTTCGT CCGCACTTAC GACACAGTCG AGTTCCTTGAG
 201 CGCAGATACG AAAACAACGA CTGTAAATGT GGAAAGCAAA GACAACGGCA
 251 AGAAAACCGA AGTTAAAATC GGTGCGAAGA CTTCTGTTAT TAAAGAAAAA
 301 GACGGTAAGT TGGT TACTGG TAAAGACAAA GGCGAGAATG GTTCTTCTAC
 351 AGACGAAGGC GAAGGCTTAG T GACTGCAA AGAAGTGATT GATGCAGTAA
 401 ACAAGGCTGG TTGGAGAATG AAAACAACAA CCGCTAATGG TCAAACAGGT
 451 CAAGCTGACA AGTTTGAAC CGTTACATCA GGCACAAATG TAACCTTTGC
 501 TAGTGGTAAA GGTACAAC TG CGACTGTAAG TAAAGATGAT CAAGGCAACA
 551 TCACTGTTAT GTATGATGTA AATGTCGGCG ATGCCCTAAA CGTCAATCAG
 601 CTGCAAAACA GCGGTTGGAA TTTGGATTCC AAAGCGGTTG CAGGTTCTTC
 651 GGGCAAAGTC ATCAGCGGCA ATGTTTCGCC GAGCAAGGGA AAGATGGATG
 701 AAACCGTCAA CATTAA TGCC GGCAACAACA TCGAGATTAC CCGCAACGGT
 751 AAAAATATCG ACATCGCCAC TTCGATGACC CCGCAGTTTT CCAGCGTTTC
 801 GCTCGGCGCG GGGGCGGATG CGCCC ACTTT GAGCGTGGAT GGGGACGCAT
 851 TGAATGTCGG CAGCAAGAAG GACAACAAC CCGTCCGCAT TACCAATGTC
 901 GCCCCGGGCG TTAAAGAGGG GGATGTTACA AACGTCCGCAC AACTTAAAGG
 951 CGTGGCGCAA AACTTGAACA ACCGCATCGA CAATGTGGAC GGCAACGCGC
 1001 GTGCGGGCAT CGCCCAAGCG ATTGCAACCG CAGGTCTGGT TCAGGCGTAT
 1051 TTGCCCGGCA AGAGTATGAT GCGGATCGGC GGCGGCACTT ATCGCGGCGA
 1101 AGCCGTTAC GCCATCGGCT ACTCCAGTAT TTCCGACGGC GGAAATTGGA
 1151 TTATCAAAGG CACGGCTTCC GGCAATTCGC GCGGCCATTT CCGTGCTTCC
 1201 GCATCTGTCC GTTATCAGTG GTAA

B

FIG. 7

1 MNKIYRIIWN SALNAWVVVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVQAS
 51 ANRAASVKDV LNAGWNIKGV KPGTTASDNV DFVRTYDTVE FLSADTKTTT
 101 VNVESKDNGK KTEVKIGAKT SVIKEKDGKL VTGKDKGENG SSTDEGEGLV
 151 TAKEVIDAVN KAGWRMKTTT ANGQTGQADK FETVTSGTNV TFASGKGTTA
 201 TVSKDDQGNi TVMYDVNVGD ALNVNQLQNS GWNLDSKAVA GSSGKVISGN
 251 VSPSKGKMDE TVNINAGNNI EITRNGKNID IATSMT PQFS SVSLGAGADA
 301 PTLSDVDGDAL NVGSKKDNKP VRITNVAPGV KEGDVTNVAQ LKGVAQNLNN
 351 RIDNVDGNAR AGIAQAIATA GLVQAYLPGK SMMAIGGGTY RGEAGYAIGY
 401 SSISDGGNWI IKGTASGNSR GHFGASASVG YQW*

A

1 ATGAACAAAA TATACCGCAT CATTGGAAT AGTGCCCTCA ATGCATGGGT
 51 CGTCGTATCC GAGCTCACAC GCAACCACAC CAAACGCGCC TCCGCAACCG
 101 TGAAGACCGC CGTATTGGCG ACTCTGTTGT TTGCAACGGT TCAGGCAAGT
 151 GCTAACCGTG CGGCAAGCGT TAAAGACGTA TTAAACGCTG GCTGGAACAT
 201 TAAAGGCGTT AAACCCGGTA CAACAGCTTC CGATAACGTT GATTTTCGTCC
 251 GCACCTACGA CACAGTCGAG TTCTTGAGCG CAGATACGAA AACACGACT
 301 GTTAATGTGG AAAGCAAAGA CAACGGCAAG AAAACCGAAG TAAAATCGG
 351 TGCGAAGACT TCTGTTATTA AAGAAAAAGA CGGTAAGTTG GTTACTGGTA
 401 AAGACAAAGG CGAGAATGGT TCTTCTACAG ACGAAGGCGA AGGCTTAGTG
 451 ACTGCAAAAG AAGTGATTGA TGCAGTAAAC AAGGCTGGTT GGAGAATGPA
 501 AACAAACAACC GCTAATGGTC AAACAGGTCA AGCTGACAAG TTTGAAACCG
 551 TTACATCAGG CACAAATGTA ACCTTTGCTA GTGGTAAAGG TACAACCTGCG
 601 ACTGTAAGTA AAGATGATCA AGGCAACATC ACTGTTATGT ATGATGTAAA
 651 TGTCGGCGAT GCCCTAAACG TCAATCAGCT GCAAAACAGC GGTGGAATT
 701 TGGATTCCAA AGCGGTTGCA GGTCTTTCGG GCAAAGTCAT CAGCGGCAAT
 751 GTTTCGCCGA GCAAGGGAAA GATGGATGAA ACCGTCAACA TTAATGCCGG
 801 CAACAACATC GAGATTACCC GCAACGGTAA AAATATCGAC ATCGCCACTT
 851 CGATGACCCC GCAGTTTTCC AGCGTTTTCCG TCGGCGCGGG GCGCGATGCG
 901 CCCACTTTGA GCGTGGATGG GGACGCATTG AATGTCGGCA GCAAGAAGGA
 951 CAACAAACCC GTCCGCATTA CCAATGTCGC CCCGGGCGTT AAAGAGGGGG
 1001 ATGTTACAAA CGTCGCACAA CTTAAAGGCG TGGCGCAAAA CTTGAACAAC
 1051 CGCATCGACA ATGTGGACGG CAACGCGCGT GCGGCGATCG CCCAAGCGAT
 1101 TGCAACCGCA GGTCTGGTTC AGGCGTATTT GCCCGGCAAG AGTATGATGG
 1151 CGATCGGCGG CGGCACCTAT CGCGGCGAAG CCGGTTACGC CATCGGCTAC
 1201 TCCAGTATTT CCGACGGCGG AAATTGGATT ATCAAAGGCA CGGCTTCCGG
 1251 CAATTCGCGC GGCCATTTCC GTGCTTCCGC ATCTGTCGGT TATCAGTGGT
 1301 AA

B

FIG. 8

1 MNKIYRIIWN SALNAWVVVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVQAS
 51 ANTLKAGDNL KIKQFTYSLK KDLTDLTSVG TEKLSFSANG NKVNITSDTK
 101 GLNFAKETAG TNGDTTVHLN GIGSTLTDRASVSKDVLNAG WNIKGVKNVD
 151 FVRTYDTVEF LSADTKTTTV NVESKDNGKK TEVKIGAKTS VIKKEDGKLV
 201 TGKDKGENGS STDEGEGLVT AKEVIDAVNK AGWRMKTTTA NGQTGQADKF
 251 ETVTSGTNTV FASGKGTTAT VSKDDQGNIT VMYDVNVGDA LNVNQLQNSG
 301 WNLDSKAVAG SSGKVISGNV SPSKGMDET VNINAGNNIE ITRNGKNIDI
 351 ATSMTPQFSS VSLGAGADAP TLSVDGDALN VGSKKDNKPV RITNVAPGVK
 401 EGDVTNVAQL KGVAQNLNLR IDNVDGNARA GIAQAIATAG LVQAYLPGKS
 451 MMAIGGGTYR GEAGYAIGYS SISDGGNWII KGTASGNSRG HFGASASVGY
 501 QW*

A

1 ATGAACAAAA TATACCGCAT CATTTGGAAT AGTGCCCTCA ATGCATGGGT
 51 CGTCGTATCC GAGCTCACAC GCAACCACAC CAAACGCGCC TCCGCAACCG
 101 TGAAGACCGC CGTATGGCG ACTCTGTTGT TTGCAACGGT TCAGGCAAGT
 151 GCTAACACCC TCAAAGCCGG CGACAACCTG AAAATCAAAC AATTCACCTA
 201 CTCGCTGAAA AAAGACCTCA CAGATCTGAC CAGTGTGGGA ACTGAAAAAT
 251 TATCGTTTAG CGCAAACGGC AATAAAGTCA ACATCACAAG CGACACCAAA
 301 GGCTTGAATT TTGCGAAAGA AACGGCTGGG ACGAACGGCG ACACCACGGT
 351 TCATCTGAAC GGTATTGGTT CGACTTTGAC CGATCGTGCG GCAAGCGTTA
 401 AAGACGTATT AAACGCTGGC TGGAACATTA AAGGCGTTAA AAACGTTGAT
 451 TTCGTCCGCA CTTACGACAC AGTCGAGTTC TTGAGCGCAG ATACGAAAAC
 501 AACGACTGTT AATGTGGAAA GCAAAGACAA CGGCAAGAAA ACCGAAGTTA
 551 AAATCGGTGC GAAGACTTCT GTTATTAAG AAAAAGACGG TAAGTTGGTT
 601 ACTGGTAAAG ACAAAGCGCA GAATGGTTCT TCTACAGACG AAGGCGAAGG
 651 CTTAGTGAAT GCAAAAGAAG TGATTGATGC AGTAAACAAG GCTGGTTGGA
 701 GAATGAAAAC AACAAACCGT AATGGTCAAA CAGGTCAAGC TGACAAGTTT
 751 GAAACCGTTA CATCAGGCAC AAATGTAACC TTTGCTAGTG GTAAAGGTAC
 801 AACTGCGACT GTAAGTAAAG ATGATCAAGG CAACATCACT GTTATGTATG
 851 ATGTAATGT CGGCGATGCC CTAACCGTCA ATCAGCTGCA AAACAGCGGT
 901 TGGAAATTTG ATTCCAAAGC GGTTCAGGT TCTTCGGGCA AAGTCATCAG
 951 CGGCAATGTT TCGCCGAGCA AGGGAAAGAT GGATGAAACC GTCAACATTA
 1001 ATGCCGGCAA CAACATCGAG ATTACCCGCA ACGGTAAAAA TATCGACATC
 1051 GCCACTTCGA TGACCCCGCA GTTTTCCAGC GTTTCGCTCG GCGCGGGGGC
 1101 GGATGCGCCC ACTTTGAGCG TGGATGGGGA CGCATTGAAT GTCGGCAGCA
 1151 AGAAGGACAA CAAACCCGTC CGCATTACCA ATGTCGCCCC GGGCGTTAAA
 1201 GAGGGGGATG TTACAAACGT CGCACAACCT AAAGGCGTGG CGCAAACTT
 1251 GAACAACCGC ATCGACAATG TGGACGGCAA CGCGCGTGCG GGCATCGCCC
 1301 AAGCGATTGC AACCAGAGT CTGGTTCAGG CGTATTTGCC CGGCAAGAGT
 1351 ATGATGGCGA TCGGCGGCGG CACTTATCGC GGCGAAGCCG GTTACGCCAT
 1401 CGGCTACTCC AGTATTTCCG ACGGCGGAAA TTGGATTATC AAAGGCACGG
 1451 CTTCCGGCAA TTCGCGCGG CATTTCGGTG CTTCCGCATC TGTCCGGTTAT
 1501 CAGTGGTAA

B

FIG. 9

```

1
H41 MNKIYRIIKN SALNAWVAVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVOAN
PMC21 MNKIYRIIKN SALNAWVVVS DLTRNHTKRA SATVNTAVLA TLLFATVOAS
H41Studel MNKIYRIIKN SALNAWVAVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVQAN
PMC21Bgldel MNKIYRIIKN SALNAWVVVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVOAS
PMC21C1C5 MNKIYRIIKN SALNAWVVVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVOAS
C1

51
H41 ATDED...EEE ELESVQRS.V VGSIQASMEG SVELET...I SLSMTNDSKE
PMC21 ANNEEQEESY YLHPVQRTVA VLIVNSDKEG AGEKEKVEEN SDWAVYFNEK
H41Studel ATDE
PMC21Bgldel ANNE
PMC21C1C5 AN
V1

101
H41 FVDPYIVVTI KAGDNLKIKO N.TNENTNAS SFTYSLKKDL TGLINVETEK
PMC21 GVLTAREITI KAGDNLKIKO NGTN..... FTYSLKKDL TDLTSVGTEK
H41Studel ..... TGLINVETEK
PMC21Bgldel ..... TDLTSVGTEK
PMC21C1C5 .....
V1 C2 V2 C3

151
H41 LSFGANGKKV NIISDTKGLN FAKETAGTNG DTTVHLNGIG STLTDMLLNT
PMC21 LSFSAHGNKV NITSDTKGLN FAKETAGTNG DTTVHLNGIG STLTDLLNT
H41Studel LSFGANGKKV NIISDTKGLN FAKETAGTNG DTTVHLNGIG STLTDMLLNT
PMC21Bgldel LSFSANGNKV NITSDTKGLN FAKETAGTNG DTTVHLNGIG STLTDLLNT
PMC21C1C5 .....
C3 V3

201
H41 GATTNVTNDN VTDEKKRAA SVKDVLNAGW NIKGVKPGTT ASDNVDFVRT
PMC21 GATTNVTNDN VTDEKKRAA SVKDVLNAGW NIKGVKPGTT ASDNVDFVRT
H41Studel GATTNVTNDN VTDEKKRAA SVKDVLNAGW NIKGVKPGTT ASDNVDFVRT
PMC21Bgldel GATTNVTNDN VTDEKKRAA SVKDVLNAGW NIKGVKPGTT ASDNVDFVRT
PMC21C1C5 ..... NVDFVRT
V3 C4 V4 C5

251
H41 YDTVEFLSAD TKTTTVNVES KDNGKKTEVK IGAKTSVIKE KDGKLVGTGK
PMC21 YDTVEFLSAD TKTTTVNVES KDNGKKTEVK IGAKTSVIKE KDGKLVGTGD
H41Studel YDTVEFLSAD TKTTTVNVES KDNGKKTEVK IGAKTSVIKE KDGKLVGTGK
PMC21Bgldel YDTVEFLSAD TKTTTVNVES KDNGKKTEVK IGAKTSVIKE KDGKLVGTGD
PMC21C1C5 YDTVEFLSAD TKTTTVNVES KDNGKKTEVK IGAKTSVIKE KDGKLVGTGD
C5

301
H41 KGENGSSTDE G EGLVTAKEV IDAVNKAGWR MKTTTANGQT GQADKFETVT
PMC21 KGENGSSTDE G EGLVTAKEV IDAVNKAGWR MKTTTANGQT GQADKFETVT
H41Studel KGENGSSTDE G EGLVTAKEV IDAVNKAGWR MKTTTANGQT GQADKFETVT
PMC21Bgldel KGENGSSTDE G EGLVTAKEV IDAVNKAGWR MKTTTANGQT GQADKFETVT
PMC21C1C5 KGENGSSTDE G EGLVTAKEV IDAVNKAGWR MKTTTANGQT GQADKFETVT
C5

351
H41 SGTKVTFASS NGTTATVSKD DOGNITVKYD VNVGDALNVN QLONSGWNLD
PMC21 SGTNVTFASS KGTTATVSKD DOGNITVMYD VNVGDALNVN QLONSGWNLD
H41Studel SGTKVTFASS NGTTATVSKD DOGNITVKYD VNVGDALNVN QLONSGWNLD
PMC21Bgldel SGTNVTFASS KGTTATVSKD DOGNITVMYD VNVGDALNVN QLONSGWNLD
PMC21C1C5 SGTNVTFASS KGTTATVSKD DOGNITVMYD VNVGDALNVN QLONSGWNLD
C5

```

FIG. 10

	401		450
H41	<u>SKAVAGSSGK VISGNVSPSK GKMDETVNIN AGNNIEITRN GKNIDIATSM</u>		
PMC21	<u>SKAVAGSSGK VISGNVSPSK GKMDETVNIN AGNNIEITRN GKNIDIATSM</u>		
H41Studel	<u>SKAVAGSSGK VISGNVSPSK GKMDETVNIN AGNNIEITRN GKNIDIATSM</u>		
PMC21Bgldel	<u>SKAVAGSSGK VISGNVSPSK GKMDETVNIN AGNNIEITRN GKNIDIATSM</u>		
PMC21C1C5	<u>SKAVAGSSGK VISGNVSPSK GKMDETVNIN AGNNIEITRN GKNIDIATSM</u>		
	C5		
	451		500
H41	<u>TPOFSSVSLG AGADAPTLV DDEGALNVGS KDANKPVRIT NVAPGVKEGD</u>		
PMC21	<u>TPOFSSVSLG AGADAPTLV DG.DALNVGS KKDANKPVRIT NVAPGVKEGD</u>		
H41Studel	<u>TPOFSSVSLG AGADAPTLV DDEGALNVGS KDANKPVRIT NVAPGVKEGD</u>		
PMC21Bgldel	<u>TPOFSSVSLG AGADAPTLV DG.DALNVGS KKDANKPVRIT NVAPGVKEGD</u>		
PMC21C1C5	<u>TPOFSSVSLG AGADAPTLV DG.DALNVGS KKDANKPVRIT NVAPGVKEGD</u>		
	C5		
	501		550
H41	<u>VTNVAQLKGV AONLNNRIDN VNGNARAGIA QAIATAGLVQ AYLPGKSMMA</u>		
PMC21	<u>VTNVAQLKGV AONLNNRIDN VDGNARAGIA QAIATAGLVQ AYLPGKSMMA</u>		
H41Studel	<u>VTNVAQLKGV AONLNNRIDN VNGNARAGIA QAIATAGLVQ AYLPGKSMMA</u>		
PMC21Bgldel	<u>VTNVAQLKGV AONLNNRIDN VDGNARAGIA QAIATAGLVQ AYLPGKSMMA</u>		
PMC21C1C5	<u>VTNVAQLKGV AONLNNRIDN VDGNARAGIA QAIATAGLVQ AYLPGKSMMA</u>		
	C5		
	551		600
H41	<u>IGGGTYLGEA GYAIGYSSIS AGGNWIIKGT ASGNSRGHFG ASASVGYQW.</u>		
PMC21	<u>IGGGTYRGEA GYAIGYSSIS DGGNWIKGT ASGNSRGHFG ASASVGYQW.</u>		
H41Studel	<u>IGGGTYLGEA GYAIGYSSIS AGGNWIIKGT ASGNSRGHFG ASASVGYQW.</u>		
PMC21Bgldel	<u>IGGGTYRGEA GYAIGYSSIS DGGNWIKGT ASGNSRGHFG ASASVGYQW.</u>		
PMC21C1C5	<u>IGGGTYRGEA GYAIGYSSIS DGGNWIKGT ASGNSRGHFG ASASVGYQW.</u>		
	C5		

FIG. 10 cont.

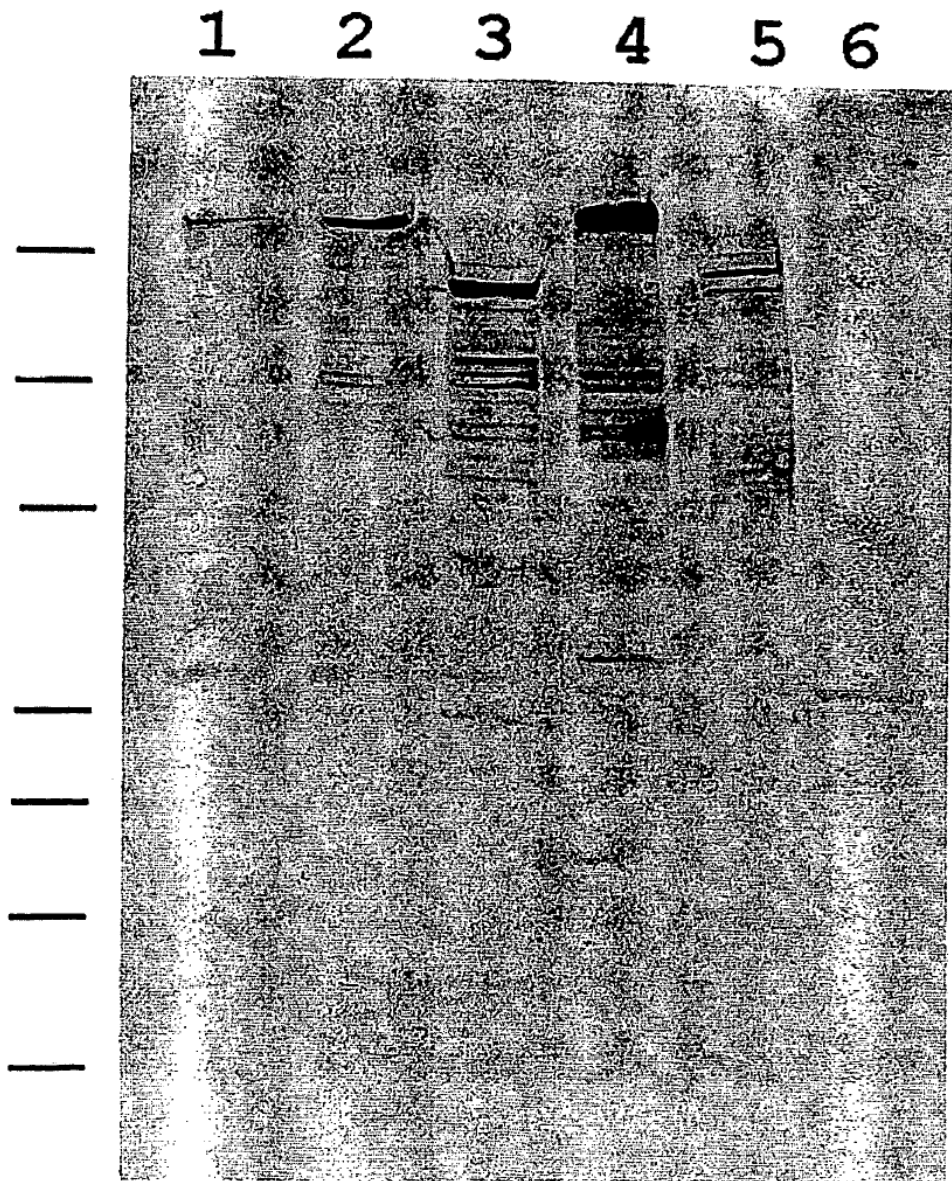


FIG. 11

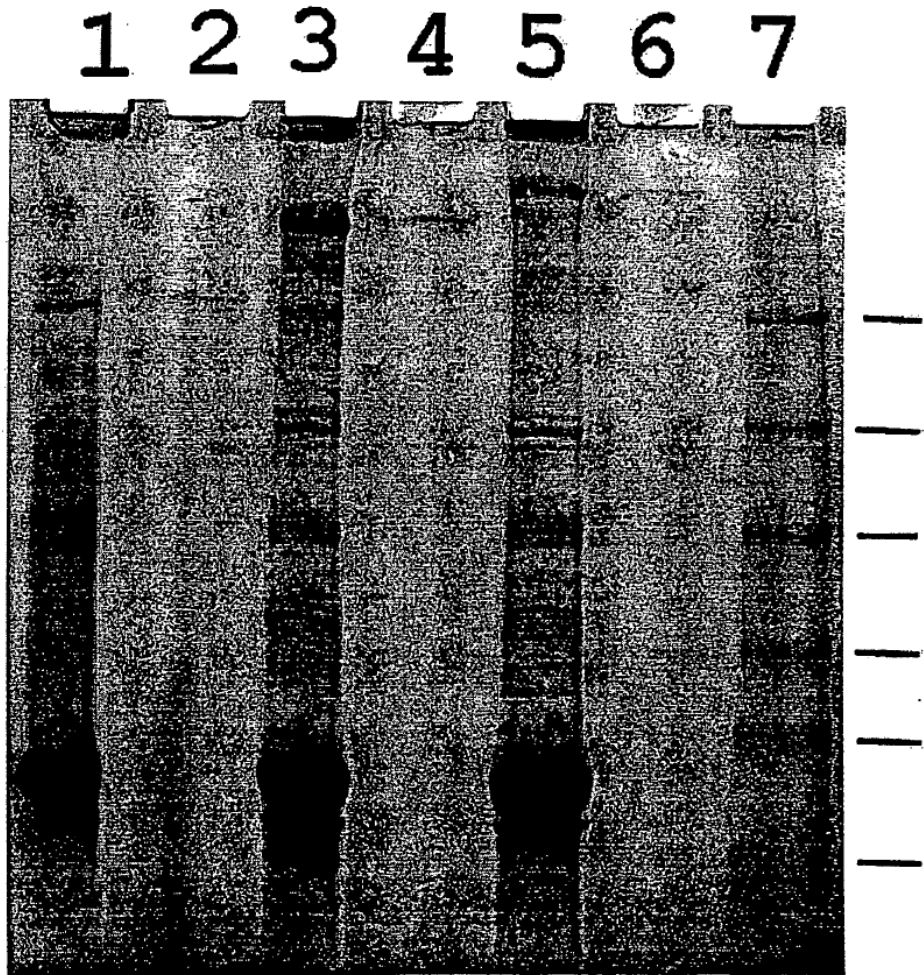
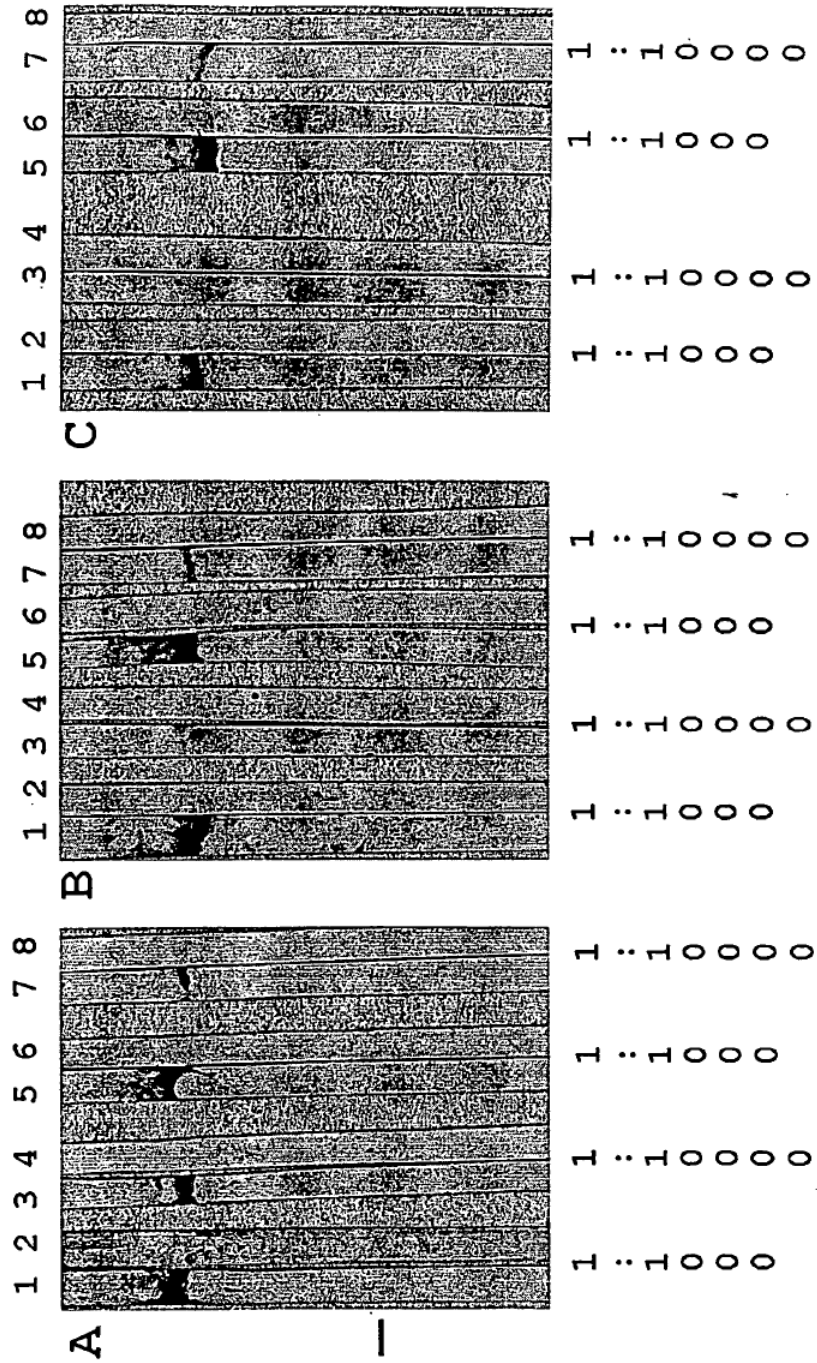


FIG. 12



173—

FIG. 13

A

52 NNEEQEEYL YLHPVQRTVA VLIVNSDKEG AGEKEKVEEN SDWAVYFNEK
 101 GVLTAAREITL KAGDNLKIKQ NGTNFTYSLK KDLTDLTSVG TEKLSFSAHG
 151 NKNVITSDTK GLNFAKETAG TNGDTTVHLN GIGSTLTDL LNTGATTNVT
 201 NDNVTDDEKK RAASVKDVLN AGWNIKGVKP GTTASDNVDF VRTYDTVEFL
 251 SADTKTTTVN VESKDNGKKT EVKIGAKTSV IKEKDGLVT GKDKGENGSS
 301 TDEGEGLVTA KEVIDAVNKA GWRMKT TAN GQTGQADKFE TVTSGTNVTF
 351 ASGKGTTATV SKDDQGNITV MYDVNVGDAL NVNQLQNSGW NLDSKAVAGS
 401 SGKVISGNVS PSKGMDETV NINAGNNIEI TRNGKNIDIA TSMTPOFSSV
 451 SLGAGADAPT LSVGDALNV GSKKDNKPVR ITNVAPGVKE GDVTNVAQLK
 501 GVAQNLNRI DNVGNARAG IAQAIATAGL VQAYLPGKSM MAIGGGTYRG
 551 EAGYAIGYSS ISDGGNWIIGTASGNSRHFASASVGYQ W*

B

52 TDEDEEEEL ESVQRSVVGSIQASMEGSVE LETISLSMTN DSKEFVDPYI
 101 VVTLKAGDNL KIKQNTNENT NASSFTYSLK KDLTGLINVE TEKLSFGANG
 151 KKVNIISDTK GLNFAKETAG TNGDTTVHLN GIGSTLTDML LNTGATTNVT
 201 NDNVTDDEKK RAASVKDVLN AGWNIKGVKP GTTASDNVDF VRTYDTVEFL
 251 SADTKTTTVN VESKDNGKKT EVKIGAKTSV IKEKDGLVT GKDKGENGSS
 301 TDEGEGLVTA KEVIDAVNKA GWRMKT TAN GQTGQADKFE TVTSGTKVTF
 351 ASGNGTTATV SKDDQGNITV KYDVNVGDAL NVNQLQNSGW NLDSKAVAGS
 401 SGKVISGNVS PSKGMDETV NINAGNNIEI TRNGKNIDIA TSMTPOFSSV
 451 SLGAGADAPT LSVDDGALN VGSKDANKPV RITNVAPGVK EGDVTNVAQL
 501 KGVAQNLNRI IDNVGNARA GIAQAIATAG LVQAYLPGKS MMAIGGGTYL
 551 GEAGYAIGYS SISAGGNWIIKGTASGNSRHFASASVGY QW*

FIG. 14

C

52 NNETDLTSV GTEKLSFSAN GNKVNITS DT KGLNFAKETA GTNGDTTVHL
 101 NGIGSTLTDT LLNTGATTNV TNDNVT DDEK KRAASVKDVL NAGWNIKGVK
 151 PGTTASDNVD FVRTYDTVEF LSADTKTTTV NVESKDNGKK TEVKIGAKTS
 201 VIKEKDGKLV TGKDKGENGS STDEGEGLVT AKEVIDAVNK AGWRMKT TTA
 251 NGQTGQADKF ETVTSGTNVT FASGKGTTAT VSKDDQGNIT VMYDVNVGDA
 301 LNVNQLQNSG WNLDKAVAG SSGKVISGNV SPSKGMDET VNINAGNNIE
 351 ITRNGKNIDI ATSMTPQFSS VSLGAGADAP TLSVDGDALN VGSKKDNKPV
 401 RITNVAPGVK EGDVTNVAQL KGVAQNLNNR IDNV DGNARA GIAQAIATAG
 451 LVQAYLPGKS MMAIGGGTYR GEAGYAIGYS SISDGGNWII KGTASGNSRG
 501 HFGASASVGY QW*

D

52 TDETGLINV ETEKLSFGAN GKKVNIISDT KGLNFAKETA GTNGDTTVHL
 101 NGIGSTLTDM LLNTGATTNV TNDNVT DDEK KRAASVKDVL NAGWNIKGVK
 151 PGTTASDNVD FVRTYDTVEF LSADTKTTTV NVESKDNGKK TEVKIGAKTS
 201 VIKEKDGKLV TGKKGGENGS STDEGEGLVT AKEVIDAVNK AGWRMKT TTA
 251 NGQTGQADKF ETVTSGTKVT FASGNGTTAT VSKDDQGNIT VKYDVNVGDA
 301 LNVNQLQNSG WNLDKAVAG SSGKVISGNV SPSKGMDET VNINAGNNIE
 351 ITRNGKNIDI ATSMTPQFSS VSLGAGADAP TLSVDDEGAL NVGSKDANKP
 401 VRITNVAPGV KEGDVTNVAQ LKGVAQNLNN RIDNVNGNAR AGIAQAIATA
 451 GLVQAYLPGK SMAIGGGTY LGEAGYAIGY SSISAGGNWI IKGTASGNSR
 501 GHFGASASVG YQW*

FIG. 14

E

52 NNVDFVRTY DTVEFLSADT KTTTVNVESK DNGKKTEVKI GAKTSVIKEK
 101 DGKLVTKGDK GENGSSTDEG EGLVTAKEVI DAVNKAGWRM KTTTANGQTG
 151 QADKFETVTS GTNVTFASGK GTTATVSKDD QGNITVMYDV NVGDALNVNQ
 201 LQNSGWNLDS KAVAGSSGKV ISGNVSPSKG KMDETVNINA GNNIEITRNG
 251 KNIDIATSMT PQFSSVSLGA GADAPTLSVD GDALNVGSKK DNKPVRITNV
 301 APGVKEGDVT NVAQLKGVAQ NLNNRIDNVD GNARAGIAQA IATAGLVQAY
 351 LPGKSMMMAIG GGTyrGEAGY AIGYSSISDG GNWIIKGTAS GNSRGHFGAS
 401 ASVGYQW*

F

52 NRAASVKDV LNAGWNIKGV KPGTTASDNV DFVRTYDTVE FLSADTKTTT
 101 VNVESKDNGK KTEVKIGAKT SVIKEKDGLK VTGKDKGENG SSTDEGEGLV
 151 TAKEVIDAVN KAGWRMKT TT ANGQTGQADK FETVTSGTNV TFASGKGTTA
 201 TVSKDDQGNI TVMYDVNVGD ALNVNQLQNS GWNLDSKAVA GSSGKVISGN
 251 VSPSKGKME TVNINAGNNI EITRNGKNID IATSMTPOFS SVSLGAGADA
 301 PTLSDVDGAL NVGSKDNKP VRITNVAPGV KEGDVTNVAQ LKGVAQNLNN
 351 RIDNVDGNAR AGIAQAIATA GLVQAYLPK SMAIGGGTY RGEAGYAIGY
 401 SSISDGGNWI IKGTASGNSR GHFGASASVG YQW*

G

50 SANTLKAGDNL KIKQFTYSLK KDLTDLTSVG TEKLSFSANG NKVNITSDTK
 101 GLNFAKETAG TNGDTTVHLN GIGSTLTDRA ASVKDVLNAG WNIKGVKNVD
 151 FVRTYDTVEF LSADTKTTTV NVESKDNGKK TEVKIGAKTS VIKEKDGLV
 201 TGKDKGENGS STDEGEGLVT AKEVIDAVNK AGWRMKT TTA NGQTGQADKF

 251 ETVTSGTNVT FASGKGTTAT VSKDDQGNIT VMYDVNVGDA LNVNQLQNSG
 301 WNLDKAVAG SSGKVISGNV SPSKGMDET VNINAGNNIE ITRNGKNIDI
 351 ATSMTPQFSS VSLGAGADAP TLSVDGDALN VGSKDNKPV RITNVAPGVK
 401 EGDVTNVAQL KGVAQNLNNR IDNVDGNARA GIAQAIATAG LVQAYLPKGS
 451 MMAIGGGTYR GEAGYAIGYS SISDGGNWII KGTASGNSRG HFGASASVGY
 501 QW*

FIG. 14