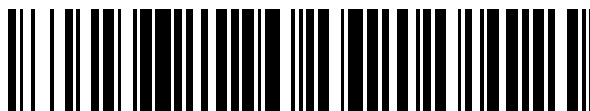


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 422**

51 Int. Cl.:

C07K 14/22 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2005 E 05786178 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1784419**

54 Título: **Dominios y epítopes de proteínas meningocócicas NMB 1870**

30 Prioridad:

01.09.2004 GB 0419408

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)
VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA SI, IT**

72 Inventor/es:

**MASIGNANI, VEGA;
SCARSELLI, MARIA;
RAPPUOLI, RINO;
PIZZA, MARIAGRAZIA;
GIULIANI, MARZIA;
DI MARCELLO, FEDERICA;
VEGGI, DANIELE y
CIUCCHI, LAURA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 422 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dominios y epítopes de proteínas meningocócicas NMB 1870

Campo técnico

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

Técnica anterior

10 *Neisseria meningitidis* es una bacteria Gram-negativa encapsulada que coloniza el tracto respiratorio superior de aproximadamente el 10% de la población humana. Aunque se dispone de las vacunas de polisacáridos y conjugados contra los serogrupos A, C, W135 e Y, esta estrategia no puede aplicarse al serogrupo B porque el polisacárido capsular es un polímero de ácido polisialico, que es un autoantígeno en seres humanos. Para desarrollar una vacuna contra el serogrupo B, se han usado proteínas expuestas en superficie contenidas en las vesículas de la membrana externa (VME). Estas vacunas provocan respuestas de anticuerpos bactericidas en suero y protegen contra la enfermedad, pero no inducen protección cruzada entre cepas[1]. Algunos investigadores, por tanto, se han centrado en antígenos meningocócicos específicos para su uso en vacunas.

15 Uno de estos antígenos es 'NMB1870'. Esta proteína se denominó inicialmente proteína '741' de la cepa MC58 [SEC ID N° 2535 y 2536 en la ref. 2; SEC ID 1 en el presente documento], y también se ha denominado 'GNA1870' [ref. 3, después de la referencia 4] y 'ORF2086' [5,6]. Esta proteína se expresa en todos los serogrupos de meningococos y se ha encontrado en múltiples cepas de meningococos. Las secuencias de NMB1870 se han agrupado en tres familias, y se ha encontrado que el suero producido contra una familia determinada es bactericida dentro de la misma familia, pero no es activo contra cepas que expresan una de las otras dos familias, es decir, existe una protección cruzada dentro de la familiar pero no hay una protección cruzada entre familias.

20 Por tanto, para conseguir protección cruzada entre cepas usando NMB1870, se usa más de una familia. Para evitar la necesidad de expresar y purificar proteínas separadas, se ha propuesto expresar diferentes familias como proteínas híbridas [7], incluidas dos o tres de las tres familias en una sola cadena polipeptídica. Se han ensayado diversos híbridos y han proporcionado una alentadora eficacia anti-meningocócica.

25 Es un objeto de la invención proporcionar más y mejores estrategias para superar la especificidad de la familia de la protección proporcionada por NMB1870 y para usar estas estrategias para proporcionar inmunidad contra la enfermedad y/o infección meningocócicas, particularmente para el serogrupo B.

Descripción de la invención

30 Los inventores han descubierto que NMB1870 expone algunos de sus epítopes en bucles de superficie situados entre hélices alfa. La sustitución de epítopes bucle de una familia en la posición bucle de otra familia permite que se produzcan NMB1870 quiméricas con antigenicidad multifamiliar.

35 Por tanto la invención proporciona proteínas NMB1870 quiméricas que comprenden partes de NMB1870 de diferentes familias como se define en las reivindicaciones. Mientras que cada familia de NMB1870 puede provocar anticuerpos (*por ejemplo* en ratones) que son eficaces solo contra cepas en la misma familia NMB1870, los polipéptidos quiméricos de la invención pueden provocar anticuerpos que reconozcan proteínas NMB1870 de más de una familia.

40 Las respuestas de anticuerpos bactericidas se miden convenientemente en ratones y son un indicador patrón de la eficacia de la vacuna [*por ejemplo* véase la nota final 14 de la referencia 4]. Las proteínas quiméricas pueden provocar preferentemente una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra al menos una cepa de *N. meningitidis* de cada uno de al menos dos de los siguientes tres grupos de cepas:

- 45 (I) MC58, gb185 (=M01-240185), m4030, m2197, m2937, iss1001, NZ394/98, 67/00, 93/114, bz198, m1390, nge28, lnp17592, 00-241341, f6124, 205900, m198/172, bz133, gb149 (=M01-240149), nm008, nm092, 30/00, 39/99, 72/00, 95330, bz169, bz83, cu385, h44/76, m1590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44/89, 14847.
 (II) 961-5945, 2996, 96217, 312294, 11327, a22, gb013 (=M01-240013), e32, m1090, m4287, 860800, 599, 95N477, 90-18311, c11, m986, m2671, 1000, m1096, m3279, bz232, dk353, m3697, ngh38, L93/4286.
 (III) M1239, 16889, gb355 (=M01-240355), m3369, m3813, ngp165.

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

Preferentemente, el polipéptido quimérico puede provocar una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra al menos el 50% de las cepas meningocócicas del serogrupo B clínicamente importantes (*por ejemplo* 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más). El polipéptido quimérico puede provocar una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B y cepas de al menos uno (*por ejemplo* 1, 2, 3, 4) de los serogrupos A, C,

W135 e Y. El polipéptido quimérico puede provocar una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas de *N. gonococcus* y/o *N. cinerea*. El polipéptido quimérico puede provocar una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas de al menos dos de las tres ramas principales del dendrograma mostrado en la Figura 5 de la referencia 3.

- 5 El polipéptido quimérico puede provocar una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra las cepas de *N. meningitidis* en al menos 2 (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7) de los linajes hipervirulentos ET-37, ET-5, grupo A4, linaje 3, subgrupo I, subgrupo III y subgrupo IV-1 [8,9]. Adicionalmente las quimeras pueden provocar respuestas de anticuerpos bactericidas contra uno o más de linajes hiperinvasivos.

- 10 Las quimeras pueden provocar una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra las cepas de *N. meningitidis* al menos en 2 (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7) de los siguientes tipos de secuencia multilocus: ST1, ST4, ST5, ST8, ST11, ST32 y ST41 [10]. La quimera también puede provocar una respuesta de anticuerpos que es bactericida contra cepas ST44.

- 15 La composición no tiene que inducir anticuerpos bactericidas contra todas y cada una de cepas de meningococo del serogrupo B, MenB, en los linajes especificados o MLST; sino que, para cualquier grupo determinado de cuatro o más cepas del meningococo del serogrupo B en un linaje hipervirulento particular o MLST, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra el menos el 50% (por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos de cepas preferidos incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR, y CU. Preferentemente, el suero tiene un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o mayor, preferentemente al menos 2^{14}) es decir, el suero puede destruir al menos el 50% de las bacterias de ensayo de una cepa particular cuando está diluida al 1:1024, como se describe, por ejemplo, en la nota final 14 de la referencia 4. Los polipéptidos quiméricos preferidos pueden provocar una respuesta de anticuerpos en ratones que permanezca bactericida incluso cuando el suero se ha diluido al 1:4096 o más.

La SEC ID N°: 1 es la secuencia de longitud completa de NMB 1870 de la familia I de la cepa MC58 del serogrupo B:

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLK
LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQ
IQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLP EGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGNNG
KIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNG
25 IRHIGLAAKQ

Se destaca el extremo N de la lipoproteína madura procesada (Cys-20).

- 30 Las secuencias de NMB1870 se incluyen dentro de tres familias [3,7] que en el presente documento se denominan familias I, II y III. Las secuencias prototípicas para las familias I-III son, respectivamente, las SEC ID Nos: 1-3. Los procedimientos filogenéticos y el dendrograma de la referencia 3 pueden seguirse para determinar fácilmente la familia para cualquier secuencia de NMB1870 determinada, y también puede usarse un alineamiento por pares con cada una de las tres secuencias de NMB1870 prototípicas para encontrar la coincidencia de familia más cercana. Las secuencias se incluyen claramente en las tres familias, siendo la identidad de secuencia del 74,1% entre las familias I y II, del 62,8% entre las familias I y III y del 84,7% entre las familias II y III y siendo la variación de secuencia dentro de cada familia baja (por ejemplo un mínimo de identidad del 91,6% en la familia I, del 93,4% en la familia II y del 93,2% en la familia III). Como un modo rápido de determinar la secuencia de una familia sin necesitar un análisis filogenético, puede introducirse una secuencia en la familia I si esta tiene una identidad de secuencia de al menos 85% con la SEC ID N°: 1, puede introducirse en la familia II si tiene una identidad de secuencia de al menos 85% con la SEC ID N°: 2 y puede introducirse en la familia III si tiene una identidad de secuencia de al menos 85% con la SEC ID N°: 3.

40 **Bucles de superficie de NMB1870**

Los bucles de superficie de la SEC ID N°: 1, que se sitúan entre las hélices alfa son: (1) los aminoácidos 134-141; (2) los aminoácidos 162-168; (3) los aminoácidos 181-182; (4) el aminoácido 197; (5) los aminoácidos 219-223; (6) los aminoácidos 234-236; (7) aminoácidos 261-267:

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLK
LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQ
IQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLP EGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGNNG
KIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNG
IRHIGLAAKQ

Alineando la SEC ID N°: 1 con cualquier otra secuencia de NMB1870, el experto en la materia puede identificar las posiciones de los bucles (1) a (7) en esa secuencia. Sin embargo, para simplificar referencias, en el presente documento las coordenadas de un bucle se definen como la serie de aminoácido (aminoácidos) en una secuencia de NMB 1870 que, cuando se alinea con la SEC ID N°:1, usando un algoritmo de alineamiento por parejas, comienza con el aminoácido alineado con el primer resto de aminoácido del bucle definido anteriormente en la SEC ID N°: 1 y termina con el último aminoácido del bucle definido anteriormente en la SEC ID N°: 1.

Construcción de secuencias de NMB1870 químicas

La invención proporciona un procedimiento para producir una secuencia de aminoácidos de NMB1870 química, como se define en la reivindicación 1.

- 10 Las etapas (b) a (d) pueden realizarse más de una vez para el mismo alineamiento de la etapa (a), es decir, en la primera secuencia pueden realizarse sustituciones múltiples de la segunda secuencia. De manera similar, las etapas (a) a (d) pueden realizarse más de una vez, usándose opcionalmente una "segunda secuencia de aminoácidos" diferente durante las etapas (a) posteriores, es decir, una primera secuencia puede alinearse con una segunda secuencia y someterse al procedimiento de sustitución y después puede alinearse con una segunda secuencia diferente y someterse a una sustitución adicional, etc.

15 Por tanto la invención proporciona un procedimiento para producir una secuencia de aminoácidos NMB1870 química, que comprende las etapas de: (a) alinear una primera secuencia de aminoácidos NMB1870 con una segunda secuencia de aminoácidos NMB1870, para proporcionar un primer par de secuencias alineadas; (b) seleccionar una parte de la primera secuencia de aminoácidos, que comienza en el aminoácido a_1 de dicha primera secuencia de aminoácidos y acaba en el aminoácido b_1 de dicha primera secuencia de aminoácidos; (c) seleccionar una parte de la segunda secuencia de aminoácidos, que comienza en el aminoácido a_2 de dicha segunda secuencia de aminoácidos y acaba en el aminoácido b_2 de dicha segunda secuencia de aminoácidos, en la que los restos a_1 y a_2 y b_1 y b_2 se alinean en el primer par de secuencia alineadas; (d) reemplazar dicha parte de la primera secuencia de aminoácidos por dicha parte de la segunda secuencia de aminoácidos, proporcionando de esta manera una secuencia de aminoácidos NMB1870 química intermedia; (e) alinear la primera secuencia de aminoácidos NMB1870, o la secuencia química intermedia, con una tercera secuencia de aminoácidos NMB1870, para proporcionar un segundo par de secuencias alineadas; (f) seleccionar una parte de la secuencia química intermedia, que comienza en el aminoácido a_3 de la secuencia química intermedia y acaba en el aminoácido b_3 de la secuencia química intermedia; (g) seleccionar una parte de la tercera secuencia de aminoácidos, que comienza en el aminoácido a_4 de dicha tercera secuencia de aminoácidos y acaba en el aminoácido b_4 de dicha tercera secuencia de aminoácidos, en la que los restos a_3 y a_4 y b_3 y b_4 se alinean en el segundo par de secuencias alineadas y (h) reemplazar dicha parte de la secuencia química intermedia, por dicha parte de la tercera secuencia de aminoácidos, proporcionando de esta manera la secuencia de aminoácidos NMB1870 química.

Las partes seleccionadas tienen preferentemente al menos una longitud de 3 aminoácidos.

- 35 La secuencia (o secuencias) sustituidas son secuencias bucle de superficie. La invención incluye situaciones que incluyen hasta 7 sustituciones.

La invención también proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos NMB1870 química, en el que dicha secuencia de aminoácidos NMB1870 química puede obtenerse mediante el procedimiento anterior.

- 40 El procedimiento de la invención puede continuarse por la etapa adicional de producir un polipéptido que comprenda dicha secuencia de aminoácidos NMB1870 química, por ejemplo, mediante expresión de proteínas recombinantes.

Sustitución de bucle

45 Los inventores han descubierto que NMB1870 expone algunos de sus epítopes en bucles de superficie situados entre hélices alfa. La sustitución de epítopes en bucles de una familia en la posición de bucle en otra familia permite que se produzca la proteína NMB1870 química con antigenicidad multifamiliar.

Por lo tanto la invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de una primera familia de NMB1870, en el que la secuencia modificada incluye al menos una (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) secuencia en bucle de superficie de una segunda familia de NMB1870 en el lugar de una secuencia en bucle de superficie de la primera familia.

- 50 La invención también proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos:

-B₁-L₁-B₂-L₂-B₃-L₃-B₄-L₄-B₅-L₅-B₆-L₆-B₇-L₇-B₈-

en la que: (a) cada uno de dichos B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ y B₈ es: (i) un fragmento de la SEC ID N°:1; (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia $m\%$ con dicho fragmento de (i) y/o comprende un fragmento de al menos un aminoácido contiguo mm de dicho segmento de (i); (b) cada uno de dichos

L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, L₆ y L₇ es: (iii) un fragmento de la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3; siempre que al menos uno de dichos L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, L₆ y L₇ no sea un fragmento de la SEC ID N°:1

5 Por tanto el polipéptido comprende una secuencia estructural básica, en ocho partes, y siete bucles, uno entre cada parte consecutiva de la secuencia estructural, pero al menos uno de las secuencias de bucle se extrae de una secuencia NMB1870 que es de una familia NMB1870 diferente de la secuencia estructural básica. Se prefiere el uso de bucles de superficie de más de una secuencia NMB1870 diferente, y es posible insertar estos bucles en una sola secuencia estructural.

El significado de "(i) un fragmento de la SEC ID N°: 1" es el siguiente:

Coordenadas de aminoácidos dentro de la SEC ID N°:1								
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈
1	1-133	142-161	169-180	183-196	198-218	224-233	237-260	268-274

10 De manera similar, "(iii) un fragmento de la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y/o de la SEC ID N°: 3" se define de la siguiente manera:

Coordenadas de aminoácidos dentro de la SEC ID N°: 1, 2 o 3							
SEC	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇
1	134-141	162-168	181-182	197	219-223	234-236	261-267
2	134-141	162-167	180-181	196	218-222	233-235	260-266
3	142-149	170-175	188-189	204	226-230	241-243	268-274

Por ejemplo, a invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos:

-B₁-L₁-B₂-L₂-B₃-L₃-B₄-L₄-B₅-L₅-B₆-L₆-B₇-L₇-B₈-

15 en la que; B₁ es los aminoácidos 1-133 de la SEC ID N°: 1, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con dichos aminoácidos 1-133 y/o comprende un fragmento de al menos 6 aminoácidos contiguos de dichos aminoácidos 1-133; B₂ es los aminoácidos 142-161 de la SEC ID N°: 1, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con dichos aminoácidos 142-161 y/o comprende un fragmento de al menos 6 aminoácidos contiguos de dichos aminoácidos 142-161... B₈ es los aminoácidos 268-274 de la SEC ID N°: 1. L₁ es los aminoácidos 134-141 de la SEC ID N°: 2; L₂ es los aminoácidos 162-167 de la SEC ID N°: 2; L₇ es los aminoácidos 268-274 de la SEC ID N°: 3 etc.

20 La invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia global del 80% con la SEC ID N°: Q, en la que: el valor de q es al menos r; la identidad de secuencia de dicha secuencia de aminoácidos con la SEC ID N°: Q es más del 80% en las regiones estructurales de la SEC ID N°: Q; y la identidad de secuencia de dicha secuencia de aminoácidos con la SEC ID N°: Q es menor del 80% en las regiones bucle de la SEC ID N°: Q.

25 El valor de Q es 1, 2 o 3, y los límites de las regiones bucle y de las regiones estructurales se seleccionan por consiguiente de las tablas anteriores (siendo de L₁ a L₇ los bucles y de B₁ a B₈ la cadena estructural).

Polipéptidos

La invención proporciona los polipéptidos descritos anteriormente.

30 NMB1870 es una lipoproteína natural de en *N.meningitidis*. También se ha descubierto que está lipidada cuando se en *E. coli*. Los polipéptidos preferidos de la invención tienen un resto de cisteína en el extremo C, que puede estar lipidado, que comprenden, por ejemplo un grupo palmitoilo.

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

35 Los polipéptidos de la invención pueden prepararse mediante diversos medios, por ejemplo, mediante síntesis química (al menos en parte), mediante digestión de los polipéptidos más largos usando proteasas, mediante traducción desde ARN, mediante purificación del cultivo celular (por ejemplo, de la expresión recombinante o del cultivo de *N.meningitidis*). etc. La expresión heteróloga de un huésped de *E. coli* es una vía de expresión preferida (por ejemplo, en DH5a, BL21 (DE₃), BLR, etc.).

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

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

5 Los polipéptidos pueden adoptar diversas formas (por ejemplo, naturales, fusiones, glicosiladas, no glicosiladas, lipidadas, puentes de disulfuro, etc.).

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

15 El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también incluyen un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante la invención; por ejemplo, formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen dentro de la invención, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

Ácidos nucleicos

25 Como se ha definido anteriormente, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende: (a) un fragmento de al menos n nucleótidos consecutivos de dicho ácido nucleico, en el que n es 10 o más (por ejemplo 12, 14, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 500 o más); y/o (b) es una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 50% (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) con dicho ácido nucleótido.

30 Adicionalmente, la invención proporciona un ácido nucleico que puede quimerizarse con ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención, preferentemente en condiciones de "alta rigurosidad" (por ejemplo, 65 °C en una solución de SDS al 0,5%, 0,1xSSC).

Los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse en reacciones de hibridación (por ejemplo, transferencias de Northern o Southern, o en micromatrices de ácido nucleico o 'microplacas génicas') y en reacciones de amplificación (por ejemplo, PCR, SDA, SSSR, LCR, TMA, NASBA, etc.) y en tras técnicas de ácido nucleico.

35 Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse de muchas maneras, por ejemplo, por síntesis química (por ejemplo, síntesis con fosoramidita de ADN) en todo o en parte, digiriendo los ácidos nucleicos más largos usando nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), uniendo los ácidos nucleicos más cortos o los nucleótidos (usando, por ejemplo, ligasas o polimerasas), a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, etc.

40 Los ácidos nucleicos de la invención pueden adoptar diversas formas, por ejemplo, pueden ser monocatenarios, bicatenarios, vectores, cebadores, sondas, pueden estar marcados, no marcados, etc.

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

La invención incluye ácidos nucleicos que comprenden secuencias complementarias a las descritas anteriormente, por ejemplo, para antisentido o exploración, o para usar como cebadores.

45 La expresión "ácido nucleico" incluye ADN y ARN y también sus análogos, tales como los que contienen armazones modificados y también ácidos nucleicos peptídicos (ANP), etc.

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

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

Inmunización

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

5 Las composiciones de la invención también pueden usarse en un procedimiento para suscitar una respuesta de anticuerpos en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una composición inmunogénica de la invención. La respuesta de anticuerpos es, preferentemente, una respuesta de anticuerpos protectora y/o bactericida.

Las composiciones de la invención también pueden usarse en un procedimiento para proteger a un mamífero contra una infección por *Neisseria* (por ejemplo, meningocócica), que comprende administrar al mamífero una composición inmunogénica de la invención.

10 La invención proporciona polipéptidos quiméricos de la invención para su uso como medicamentos (por ejemplo, como composiciones inmunogénicas o como vacunas)

El mamífero es, preferentemente, un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o, preferentemente, un niño. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es, preferentemente, un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un lactante); cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es, preferentemente, un adulto.

15 Una vacuna para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

Los usos y procedimientos son particularmente útiles para prevenir/tratar enfermedades que incluyen, pero sin limitación, meningitis (particularmente meningitis bacteriana) y bacteriemia.

20 La eficacia del tratamiento terapéutico puede ensayarse controlando la infección por *Neisseria* después de administración de la composición de la invención. La eficacia del tratamiento profiláctico puede ensayarse controlando las respuestas inmunitarias contra NMB1870 después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse mediante su administración a sujetos de ensayo (por ejemplo niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales [13]) y, después, determinando los parámetros patrón incluidos los anticuerpos bactericidas en suero (ABS) y los títulos de ELISA (GMT, media geométrica de los títulos). Estas respuestas inmunitarias generalmente se determinarán aproximadamente 4 meses después de la administración de la composición y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un aumento de los ABS de al menos 4 u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, después de la administración puede realizarse más de una determinación.

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

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

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

45 La posología del tratamiento puede ser un programa de dosis única o de dosis múltiples. Pueden usarse dosis múltiple en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. A un programa de dosis primaria le puede seguir un programa de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis iniciales (por ejemplo entre 4-16 semanas) y entre la administración inicial y la de refuerzo puede determinarse rutinariamente.

50 La composición inmunogénica de la invención generalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser cualquier sustancia que, por sí misma, no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el paciente que recibe la composición, y que puede administrarse sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas. Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos en la materia. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. En dichos vehículos también puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tampón del pH y similares. Los liposomas son vehículos adecuados. En la referencia 14 puede encontrarse un análisis exhaustivo

de vehículos farmacéuticos.

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

La composición es, preferentemente, estéril. Preferentemente es apirógena. Preferentemente está tamponada a, por ejemplo, un pH entre 6 y 8, generalmente a un pH de aproximadamente 7. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [15]. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de inmunógeno, así como de cualquier otro componente especificado, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se quiere decir que la administración de dicha cantidad a un individuo, bien en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, el criterio del médico tratante de la situación médica y otros factores importantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos de rutina. La posología del tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo). La composición puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales, adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención, incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia 16] o mezclas de diferentes compuestos minerales, teniendo los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo gel, cristalina, amorfo, etc.) y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de una sal metálica [17].

Particularmente se prefieren fosfatos de aluminio, particularmente en composiciones que incluyen un antígeno sacárido de *H. influenzae* y un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . La adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio puede usarse, por ejemplo, entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis. Cuando en una composición hay más de un conjugado, no todos los conjugados tienen que adsorberse.

B. Emulsiones en aceite

Las composiciones en emulsión en aceite, adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención, incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [capítulo 10 de la referencia 16; véase también la referencia 18] (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5%, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). También puede usarse adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF).

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la referencia 16]

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

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Usando estas técnicas, se han identificado fracciones específicas purificadas, incluyendo QS7, QS17, QS18 QS21, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la referencia 19 se divulga un procedimiento de producción de QS21. Las formulaciones con saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol [20].

Las combinaciones de saponinas y colesterolos pueden usarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimuladores (ISCOM [capítulo 23 de la referencia 16]. Los ISCOM típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidil etanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOM puede usarse cualquier saponina. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen con mayor detalle en las referencias 20-22. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [23].

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina puede encontrarse en las referencias 24 y 25.

D. Virosomas y partículas similares a virus

Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP, *Virus Like Particle*) también pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen uno o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Generalmente son no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de manera recombinante o aislarse a partir de virus enteros. Estas proteínas virales adecuadas para usar en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), el virus de la hepatitis B (tal como proteínas del o de la cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la enfermedad pie-boca, retrovirus, virus de Norwalk, el virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205, y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Adicionalmente, las VLP se tratan con mayor detalle en las referencias 26-31. Los virosomas se tratan con mayor detalle, por ejemplo, en la referencia 32.

E. Derivados bacterianos o microbianos

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

Los derivados no tóxicos del LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-O-desacilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma en "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-O-desacilado se desvela en la referencia 33. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 μm [33]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tal como derivados de aminoalquilglucosaminida fosfato, por ejemplo, RC-529 [34,35].

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli*, tal como OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las referencias 36 y 37.

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

Los CpG pueden incluir modificaciones / análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Las referencias 38, 39 y 40 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto de adyuvante de los oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en las referencias 41-46.

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [47]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en las referencias 48-50. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias oligonucleotídicas CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 47 y 51-53.

Como adyuvantes en la invención pueden usarse toxinas bacterianas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de las mismas. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil "TL" de *E. coli*), cólera ("CT") o tosferina ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación de ADP destoxificadas, tales como adyuvantes de mucosa se describe en la referencia 54 y como adyuvantes parenterales en la referencia 55. La toxina o toxoide está, preferentemente, en forma de holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferentemente la subunidad B no ha mutado. Preferentemente, el adyuvante es un mutante LT destoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes, puede encontrarse en las referencias 56-63. Preferentemente, la referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas de ribosilación de ADP indicadas en la referencia 64, específicamente incorporadas en la presente memoria en su totalidad por referencia.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [65], etc.) [66], interferones (por ejemplo interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

5 G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [67] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. En la invención, también pueden usarse como adyuvantes el quitosano y derivados del mismo [68]

10 H. Micropartículas

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

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la referencia 16)

En las referencias 69-71 se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes.

J. Formulaciones de polioxietiléneter y polioxietilénéster

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen polioxietiléneteres y polioxietilénésteres [72]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de polioxietilén éster de sorbitán en combinación con un octoxinol [73] así como tensioactivos de polioxietilén éteres o ésteres de alquilo en combinación al menos con un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [74]. Los polioxietilén éteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilén-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilén-9-esteoriléter, polioxietilén-8-esteoriléter, polioxietilén-4-lauriléter, polioxietilén-35-lauriléter y polioxietilén-23-lauriléter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las referencias 75 y 76.

30 L. Muramil péptidos

Como ejemplos de muramil péptidos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención se incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (no-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

M. Compuestos de imidazoquinolona

35 Como ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para uso como adyuvantes en la invención se incluyen Imiquimod y sus homólogos (por ejemplo "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las referencias 77 y 78.

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados con anterioridad. Por ejemplo, en la invención pueden usarse las siguientes composiciones adyuvantes: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [79]; (2) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) [80]; (3) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroil) [81]; (5) combinaciones de 3dMPL, por ejemplo, con QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [82]; (6) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80TM al 0,4%, polímero de bloque plurónico L121 al 5% y thr-MDP, bien microfluidizados en una emulsión en submicrones o sometidos a agitación vortical para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande. (7) Sistema adyuvante RibitTM (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS, *Cell Wall Skeleton*), preferentemente MPL + CWS (DetoxTM) y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

En el capítulo 7 de la referencia 16 se desvelan otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes.

Para inmunización parenteral las sales de aluminio (fosfato de aluminio y, particularmente hidroxifosfatos y/o hidróxidos y, particularmente, oxihidróxido) y MF59 son adyuvantes preferidos. Los mutantes de toxina son adyuvante mucosos preferidos. El QS21 es otro adyuvante útil para NMB1870, que puede usarse solo o en combinación con uno o más otros diversos adyuvantes, por ejemplo, con una sal de aluminio. Los muramil péptidos incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (no-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamin MTP-PE), etc.

Otros componentes antigénicos.

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

15 La composición de la invención incluye un polipéptido NMB 1870 quimérico. También puede incluir uno o más antígenos de *Neisseria adicionales*, ya que una vacuna dirigida a más de un antígeno por bacteria disminuye la posibilidad de seleccionar mutantes de escape. Los antígenos de *Neisseria* para incluir en las composiciones incluyen proteínas que comprenden:

- (a) las 446 SEC ID pares (es decir, 2, 4, 6, ... , 890, 892) desveladas en la referencia 83.
- (b) las 45 SEC ID pares (es decir 2, 4, 6, ... , 88, 90) desveladas en la referencia 84;
- 20 (c) las 1674 SEC ID pares 2-3020, SEC ID pares 3040-3114 y todas las SEC ID 3115-3241, desveladas en la referencia 2;
- (d) las 2160 secuencias de aminoácidos de NMB0001 a NMB2160 de la referencia 4;
- (e) una proteína PorA meningocócica, de cualquier subtipo, preferentemente expresada de manera recombinante;
- 25 (f) una variante, homólogo, ortólogo, parólogo, mutante etc. de (a) a (e); o
- (g) una preparación de vesículas de la membrana externa de *N. meningitidis* [por ejemplo, véase la referencia 177].

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

- un antígeno sacárido de *N.meningitidis*, serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el oligosacárido desvelado en la referencia 85 del serogrupo C [véase también la ref. 86] o los oligosacáridos de la referencia 87.
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo 88, 89, 90].
- 35 - un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivados [por ejemplo 91, 92].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o del núcleo [por ejemplo 92, 93].
- un antígeno de difteria, tal como el toxoide de la difteria [por ejemplo capítulo 3 de la referencia 94] por ejemplo el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo 95].
- un antígeno del tétanos, tal como el toxoide del tétanos [por ejemplo capítulo 9 de la referencia 94].
- 40 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de tos ferina (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo referencias 93 y 97].
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo 86].
- un antígeno (o antígenos) de la polio [por ejemplo 98, 99] tal como IPV.
- antígenos del sarampión, paperas y/o rubeola [por ejemplo capítulos 9, 10 y 11 de la referencia 94].
- 45 - un antígeno (o antígenos) de la gripe [por ejemplo capítulo 9 de la referencia 94], tal como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo 100].
- un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) [por ejemplo 101, 102].
- un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B).
- 50 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) [por ejemplo 102, 103, 104].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo 105].

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

Cuando sea necesario, los antígenos de proteínas tóxicas pueden destoxificarse (por ejemplo, destoxificación de la toxina de la tosferina por medios químicos y/o genéticos [97]).

55 Cuando en la composición se incluye un antígeno de difteria, también se prefiere incluir antígenos del tétanos y de tosferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos, también se prefiere incluir antígenos de difteria y tosferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de tosferina, también se prefiere incluir antígenos de difteria y del tétanos. Por tanto se prefieren las combinaciones de DTP.

- Los antígenos sacáridos están, preferentemente, en forma de conjugados. Las proteínas transportadoras para los conjugados incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [106], péptidos sintéticos [107,108], proteínas de choque térmico [109,110], proteínas tosferínicas [111,112], proteínas D de *H. influenzae* [113], citocinas [114], linfocinas [114], proteínas estreptocócicas, hormonas [114], factores de crecimiento [114], toxina A o B de *C. difficile* [115], proteínas captadoras de hierro [116], etc. Una proteína transportadora preferida es el toxoide diftérico CRM197 [117].
- Típicamente, los antígenos en la composición estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno proporcionado será suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno.
- Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden usarse terapéuticamente (es decir, para tratar una infección existente) o profilácticamente (es decir, para prevenir una infección futura).
- Las composiciones de la invención pueden incluir uno, dos o tres de: (a) antígenos sacáridos de los serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococo; (b) un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B; y/o (c) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.
- Serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococo
- Las vacunas de polisacáridos contra los serogrupos A, C, W135 e Y se han conocido durante muchos años.
- Estas vacunas (MENCEVAX ACWYTM y MENOMUNETM) se basan en los polisacáridos capsulares de los organismos y, aunque son eficaces en adolescentes y en adultos, proporcionan una mala respuesta inmunitaria y una duración corta de protección y no pueden usarse en lactantes. A diferencia de los antígenos polisacáridos no conjugados en estas vacunas, las vacunas del serogrupo C recientemente aprobadas (MenjugateTM [118,85], MeningitecTM y NeisVac-CTM) incluyen sacáridos conjugados. MenjugateTM y MeningitecTM tienen antígenos oligosacáridos conjugados con un transportador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac-CTM usa el polisacárido completo (des-O-acetilado) conjugado con un transportador del toxoide tetánico. La vacuna MenactraTM contiene antígenos sacáridos capsulares conjugados de cada uno de los serogrupos Y, W135, C y A.
- Las composiciones de la presente invención incluyen, preferentemente, antígenos sacáridos capsulares de uno o más de los grupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococos, en las que los antígenos están conjugados a una proteína (o proteínas) transportadora y/o son oligosacáridos. Por ejemplo, la composición puede incluir un antígeno sacárido capsular de: serogrupo C; serogrupos A y C; serogrupos A, C y W135; serogrupos A, C e Y; serogrupos C, W135 e Y o de los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y.
- Una cantidad típica de cada antígeno sacárido de meningococo por dosis está entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg (expresados en forma de sacárido).
- Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de los grupos A y C, la proporción (p/p) del sacárido MenA: sacárido MenC puede ser superior a 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares del serogrupo Y y de uno o los dos serogrupos C y W135, la proporción (p/p) del sacárido MenY: sacárido MenW135 puede ser superior a 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior) y/o la proporción (p/p) del sacárido MenY: sacárido MenC puede ser inferior a 1 (por ejemplo 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o menor). Las proporciones (p/p) preferidas para los sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1. Las proporciones (p/p) preferidas para los sacáridos de los serogrupos C:W135:Y son: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2: 1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1; y 2:1:1. Se prefiere el uso de una masa sustancialmente igual de cada sacárido.
- Los sacáridos capsulares generalmente se usan en forma de oligosacáridos. Estos se forman convenientemente por fragmentación del polisacárido capsular purificado (por ejemplo, por hidrólisis), que normalmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.
- La fragmentación de polisacáridos se realiza, preferentemente, para proporcionar un grado medio final de polimerización (GP) en el oligosacárido menor de 30 (por ejemplo, entre 10 y 20, preferentemente de aproximadamente 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferentemente de aproximadamente 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El GP puede medirse convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayos colorimétricos [119].
- Si se realiza hidrólisis, generalmente, se medirá el tamaño del hidrolizado para eliminar los oligosacáridos de longitud corta [86]. Esto puede conseguirse de diversas maneras, tales como ultrafiltración seguida por cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización menor o igual a aproximadamente 6 se eliminan, preferentemente, para el serogrupo A y los inferiores a aproximadamente 4 se eliminan preferentemente para los serogrupos W135 e Y.
- Los antígenos sacáridos MenC preferidos se desvelan en la referencia 118 y se usan en MenjugateTM.

El antígeno sacárido puede modificarse químicamente. Esto es particularmente útil para reducir la hidrólisis para el serogrupo A [120; véase más adelante]. Puede realizarse la des-O-acetilación de los sacáridos meningocócicos. Para los oligosacáridos, la modificación puede producirse antes o después de la despolimerización.

5 Cuando una composición de la invención incluye un antígeno sacárido MenA, el antígeno es, preferentemente, un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo en el sacárido nativo se ha sustituido por un grupo bloqueante [120]. Esta modificación mejora la resistencia a la hidrólisis.

10 El número de unidades de monosacárido que tienen grupos bloqueantes puede variar. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueantes. Como alternativa, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% de las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueantes. Al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 unidades de monosacárido pueden tener grupos bloqueantes.

Del mismo modo, el número de grupos bloqueantes sobre una unidad de monosacárido puede variar. Por ejemplo, el número de grupos bloqueantes en una unidad de monosacárido puede ser 1 ó 2. El grupo bloqueante generalmente estará en la posición 4 y/o en la posición 3 de las unidades de monosacárido.

15 La unidad de monosacárido terminal puede tener o no un grupo bloqueante en lugar de su grupo hidroxilo nativo. Se prefiere conservar un grupo hidroxilo alomérico libre en una unidad de monosacárido terminal para proporcionar un soporte para reacciones adicionales (por ejemplo conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos pueden convertirse en grupos amino (-NH₂ o NH-E, en el que E es un grupo protector de nitrógeno) por aminación reductora (usando, por ejemplo, NaBH₃CN/NH₄Cl) y posteriormente pueden regenerarse después de que otros grupos hidroxilo se
20 hayan convertido en grupos bloqueantes.

25 Los grupos bloqueantes que reemplazan grupos hidroxilo pueden estar directamente accesibles mediante una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo con otro grupo. Los derivados adecuados de grupos hidroxilo que actúan como grupos bloqueantes son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo silil éteres o alquil éteres) y acetales. Algunos ejemplos específicos de dichos grupos bloqueantes son alilo, Alloc, bencilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos bloqueantes que no están directamente accesibles y que reemplazan completamente el grupo hidroxilo incluyen alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆, NR¹R² (R¹ y R² se definen en el siguiente párrafo), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo-C₁₋₆), CN, CF₃, CCl₃, etc. Los grupos bloqueantes preferidos son grupos aceptores de electrones.

30 Los grupos bloqueantes preferidos tienen la fórmula: -O-X-Y o -OR³ en la que: X es C(O), S(O) o SO₂; Y es alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede opcionalmente sustituirse con 1, 2 ó 3 grupos independientemente seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o Y es NR¹R²; R¹ y R² se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆; o R¹ y R² pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂; R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂ cada uno de los cuales puede opcionalmente sustituirse con 1, 2 ó 3 grupos independientemente
35 seleccionados de F, Cl, Br, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o R³ es arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede sustituirse opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 grupos seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H (C₁₋₆ alquilo), CN, CF₃ o CCl₃. Cuando R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, éste se sustituye típicamente con 1, 2 ó 3 grupos como se define anteriormente. Cuando R¹ y R² están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂, significa que R¹ y R² juntos con el átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier cantidad de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 ó 2 heteroátomos (tales como N, O, S) distintos del átomo de nitrógeno. Los ejemplos de grupos heterocíclicos saturados C₃₋₁₂ son pirrolidinil, piperidinil, morfolinil, piperazinil, imidazolidinil, azetidil y aziridinil.

45 Los grupos bloqueantes -O-X-Y y -OR³ pueden prepararse a partir de grupos -OH mediante procedimientos de derivatización convencionales tales como reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, etc. Por tanto el átomo de oxígeno en -O-X-Y es preferentemente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo mientras que el grupo -X-Y en -O-X-Y preferentemente sustituye el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

50 Como alternativa, los grupos bloqueantes pueden ser accesibles mediante una reacción de sustitución, tal como la sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros procedimientos para preparar grupos bloqueantes a partir de grupos hidroxilo son bien conocidos.

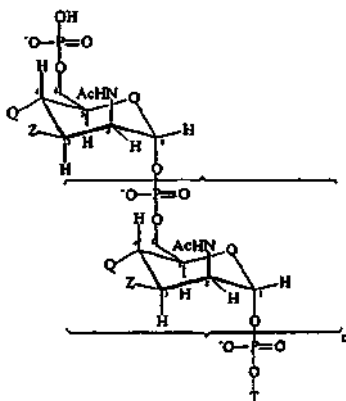
Más preferentemente, el grupo bloqueante es -OC(O)CF₃ [121] o un grupo carbamato -OC(O)NR¹R², en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente de alquilo C₁₋₆. Más preferentemente R¹ y R² son metilo, es decir, el grupo bloqueante es -OC(O)NMe₂. Los grupos bloqueantes carbamato tienen un efecto estabilizante en el enlace glicosídico y pueden prepararse en condiciones suaves.
55

Los sacáridos MenA modificados preferidos contienen *n* unidades de monosacáridos, en las que al menos el *h*% de las unidades de monosacáridos no tienen grupos -OH en las posiciones 3 y 4. El valor de *h* es 24 o más (por ejemplo 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 ó 100) y es preferentemente

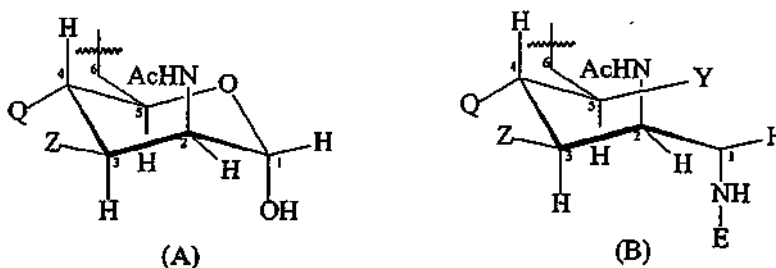
50 o más. Los grupos -OH ausentes son preferentemente grupos bloqueantes como se ha definido anteriormente.

Otros sacáridos MenA modificados preferidos comprenden unidades de monosacáridos, en el que al menos s de las unidades de monosacáridos no tienen -OH en la posición 3 y no tienen -OH en la posición 4. El valor de s es de al menos 1 (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90). Los grupos -OH ausentes son preferentemente grupos bloqueantes como se ha definido anteriormente.

Los sacáridos MenA modificados adecuados para su uso con la invención tienen la fórmula:



en la que
 10 n es un número entero de 1 a 100 (preferentemente un número entero de 15 a 25);
 T es de la fórmula (A) o (B):



15 cada grupo Z se selecciona independientemente entre OH o un grupo bloqueante como se define anteriormente; y
 cada grupo Q se selecciona independientemente entre OH o un grupo bloqueante como se define anteriormente;
 Y se selecciona entre OH o un grupo bloqueante como se define anteriormente;
 E es H o un grupo protector de nitrógeno;
 y en el que más de aproximadamente el 7% (por ejemplo, 8%, 9%, 10% o más) de los grupos Q son grupos
 bloqueantes.

20 Cada uno de los grupos $n+2$ Z pueden idénticos o diferentes entre sí. Del mismo modo, cada uno de los grupos $n+2$
 Q pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Como alternativa, al menos el 10%,
 20, 30%, 40%, 50% o 60% de los grupos Z pueden ser OAc. Preferentemente, aproximadamente el 70% de los
 grupos Z son OAc, siendo el resto de los grupos Z grupos OH o grupos bloqueantes como se ha definido
 anteriormente. Al menos aproximadamente el 7% de los grupos Q son grupos bloqueante. Preferentemente, al
 25 menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los grupos Q son grupos
 bloqueantes.

Los polisacáridos capsulares meningocócicos se preparan típicamente mediante un procedimiento que comprende
 las etapas de precipitación de polisacáridos (por ejemplo, usando un detergente catiónico), fraccionamiento
 en etanol, extracción en fenol frío (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar el LPS) [por ejemplo,
 ref. 122]. Sin embargo, un procedimiento más preferido [87] implica la precipitación del polisacárido seguida por
 30 solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior. La precipitación puede conseguirse usando un
 detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro) o
 bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Se prefiere particularmente el bromuro de
 cetiltrimetilamonio ('CTAB') [123]. La solubilización del material precipitado puede conseguirse usando un alcohol
 inferior tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilpropan-2-ol,
 35 dioles, etc., pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar los complejos CTBA-polisacárido. El etanol
 se añade preferentemente al polisacárido precipitado para proporcionar una concentración final (sobre la base del

contenido total de etanol y agua) de entre 50% y 95%.

Después de la resolubilización, el polisacárido puede tratarse adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que ni siquiera es aceptable la menor contaminación (por ejemplo, para la producción vacunas humanas). Esto implicará típicamente una o más etapas de filtración, por ejemplo filtración en profundidad, puede usarse filtración a través de carbón activado, filtración por tamaño y/o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar los contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para tratamiento y/o procesamiento adicional. Esto puede conseguirse convenientemente intercambiando cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

Como alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares pueden obtenerse por síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se desvela en la referencia 124 y síntesis de MenA en la referencia 125.

Las composiciones de la invención pueden comprender sacáridos capsulares de al menos dos serogrupos de *N.meningitidis*. Los sacáridos se preparan preferentemente por separado (incluyendo cualquier fragmentación, conjugación, modificación, etc.) y después se mezclan para dar una composición de la invención.

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

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

Las composiciones de la invención pueden usarse en un kit que comprende: (a) un primer envase que contiene sacáridos capsulares de dos o más serogrupos C, W135 e Y de *N.meningitidis*, todos en forma liofilizada; y (b) un segundo envase que contiene en forma líquida (i) una composición que, después de la administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en ese sujeto, en el que la respuesta de anticuerpos es bactericida contra dos o más (por ejemplo, 2 ó 3) de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 del serogrupo B de *N.meningitidis*, (ii) sacáridos capsulares de ninguno o uno de los serogrupos C, W135 e Y de *N.meningitidis* y opcionalmente (iii) otros antígenos (véase más adelante) que no incluyen sacáridos capsulares meningocócicos, en el que la reconstitución del contenido del envase (a) mediante el contenido del envase (b) proporciona una composición de la invención.

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

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

Las composiciones de la invención pueden comprender menos de 50 µg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones comprenden ≤ 40 µg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 30 µg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 25 µg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 20 µg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 10 µg de sacárido meningocócico por dosis pero, idealmente, las composiciones comprenden al menos 10 µg de sacárido meningocócico por dosis.

Los conjugados MenC Menjugate™ y NeisVac™ utilizan un adyuvante hidróxido, mientras que Meningitec™ utiliza un fosfato. En las composiciones de la invención es posible adsorber algunos antígenos sobre un hidróxido de

aluminio, pero tener otros antígenos asociados con un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes de serogrupos, por ejemplo, se dispone de las siguientes permutaciones:

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

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

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

Haemophilus influenzae de tipo B

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

Ventajosamente, el sacárido Hib se conjuga covalentemente a una proteína transportadora para potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos en general, y del polisacárido capsular de Hib en particular, está bien documentada [por ejemplo referencias 126 a 134 etc.]. La invención puede usar cualquier conjugado Hib adecuado. Más adelante se describen proteínas transportadoras adecuadas y los transportadores preferidos para sacáridos Hib son CRM₁₉₇ ("HbOC"), toxoide tetánico (PRP-T) y el complejo de membrana externa de *N.meningitidis*. (PRP-OMP).

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

- 15 Un conjugado preferido comprende un oligosacárido Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ mediante un engarce de ácido adípico [135, 136]. El toxoide del tétanos también es un transportador preferido.

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

20 Cuando una composición incluye un antígeno sacárido Hib, se prefiere que tampoco incluya un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno Hib puede absorberse en el adyuvante [137] o puede no adsorberse [138].

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

Streptococcus pneumoniae

25 Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, típicamente será un antígeno sacárido capsular que preferentemente está conjugado con una proteína transportadora [por ejemplo, referencias 88-90]. Se prefiere incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes se usan ampliamente, ya que son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [139]. Por ejemplo, PrevNar™ [140] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con CRM₁₉₇ por aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 µg de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos sobre adyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluyen, preferentemente, al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden adsorberse sobre fosfato de aluminio.

35 Como alternativa al uso de antígenos sacáridos de neumococos, la composición puede incluir uno o más antígenos polipeptídicos. Se dispone de secuencias genómicas para diversas cepas de neumococos [141,142] y pueden someterse a vacunología inversa [143-146] para identificar antígenos polipeptídicos adecuados [147,148]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los siguientes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128 y Sp130 como se define en la referencia 149.

En algunas realizaciones, la composición puede incluir los antígenos sacárido y polipeptídico de neumococo. Éstos pueden usarse en mezcla simple, o el antígeno sacárido neumocócico puede conjugarse con una proteína neumocócica. Las proteínas transportadoras adecuadas para tales realizaciones incluyen los antígenos indicados en el párrafo anterior [149].

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

Conjugación covalente

10 Los sacáridos capsulares en las composiciones de la invención normalmente estarán conjugados con una proteína (o proteínas) transportadora. En general, la conjugación potencia la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte de antígenos independientes de linfocitos T en antígenos dependientes de linfocitos T, lo que permite la iniciación de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisada en las referencias 150 y 126-134].

15 Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como el toxoide de difteria o toxoide del tétanos. El toxoide de difteria mutante CRM₁₉₇ [117,151,152] es particularmente preferido. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N.meningitidis* [106], péptidos sintéticos [107,108], proteínas de choque térmico [109,110], proteínas tosferínicas [111,112], citocinas [114], linfocinas [114], hormonas [114], factores de crecimiento [114], proteínas artificiales que comprenden epítopos múltiples de linfocitos T CD4⁺ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos [153], la proteína D de *H.influenzae* [113,154], la proteína de superficie neumocócica PspA [155], proteínas de captación de hierro [116], la toxina A o B de *C.difficile* [115], etc. Los transportadores preferidos son el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, la proteína D de *H.influenzae* y CRM₁₉₇.

20 Dentro de una composición de la invención, es posible el uso de más de una proteína transportadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de supresión del transportador. Por tanto, pueden usarse diferentes proteínas transportadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A podrían conjugarse con CRM₁₉₇ mientras que los sacáridos del serogrupo C podrían conjugarse con el toxoide tetánico. También es posible usar más de una proteína transportadora para un antígeno sacárido concreto, por ejemplo los sacáridos de serogrupo A podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM₁₉₇ y otros conjugados con el toxoide tetánico. Sin embargo, en general, se prefiere usar la misma proteína transportadora para todos los sacáridos.

25 Una sola proteína transportadora podría transportar más de un antígeno sacárido [156]. Por ejemplo, una sola proteína transportadora podría tener conjugados sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general, se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo.

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

35 Los conjugados pueden usarse junto con la proteína transportadora libre [157]. Cuando una proteína transportadora determinada está presente tanto en forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es, preferentemente, no superior al 5% de la cantidad total de la proteína transportadora en la composición en su conjunto y, más preferentemente, está presente a menos del 2% en peso.

40 Cuando sea necesario, puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier engarce adecuado.

El sacárido típicamente se activará o funcionalizará antes en la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación, tales como CDAP (por ejemplo 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [158,159, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 132).

45 Pueden realizarse enlaces mediante un grupo engarzador usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 160 y 161. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo engarzador de ácido adípico y, después, acoplamiento de una proteína en el otro extremo del grupo engarzador de ácido adípico [130, 162, 163]. Otros engarces incluyen B-propionamido [164], nitrofenil-etilamina [165], haluros de haloacilo [166], enlaces glicosídicos [167], ácido 6-aminocaproico [168], ADH [169], restos de C₄ a C₁₂ [170] etc. Como una alternativa al uso de un engarzador, puede usarse un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido, seguido de aminación reductora con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 171 y 172.

55 Se prefiere un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, reemplazando grupos = O terminales con -NH₂) seguido por derivación con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico) y la reacción con la proteína transportadora. Otra reacción preferida utiliza activación con

CDAP con una proteína D transportadora, por ejemplo, para MenA o MenC.

Después de la conjugación, los sacáridos conjugados y libres pueden separarse. Existen diversos procedimientos adecuados, incluidos cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las referencias 173 y 174, etc.].

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

Vesículas de la membrana externa

10 Se prefiere que las composiciones de la invención no incluyan mezclas complejas o no definidas de antígenos, que son características típicas de las VME. Sin embargo, una manera en que las VME pueden aplicarse la invención es cuando estas van a administrarse en un régimen de dosis múltiple.

15 Cuando va a administrarse más de una dosis de VME, cada dosis puede complementarse (bien añadiendo la proteína purificada o bien por expresión de la proteína dentro de las bacterias de las que derivan las VME) mediante una de la primera proteína, segunda proteína o tercera proteína como se ha definido anteriormente. Preferentemente se complementan dosis diferentes con diferentes familias de NMB1870. En un programa de tres dosis de VME, por ejemplo, cada dosis puede contener una primera proteína, segunda proteína y tercera proteína diferente de tal manera que después de recibir tres dosis de VME, se hayan recibido las tres familias. En un régimen de dos dosis de VME, puede usarse una familia por dosis de VME (omitiendo de esta manera una familia), o una o ambas dosis de VME pueden complementarse con más de una familia para proporcionar protección con las tres familias. En realizaciones preferidas, hay tres dosis de VME, y cada una de estas tres dosis de VME contiene tres poblaciones de vesículas diferentes modificadas por ingeniería genética mostrando cada una tres subtipos, proporcionando así en total, nueve subtipos diferentes.

25 Esta estrategia puede usarse en general para mejorar preparaciones de microvesículas, 'VME nativas' [176], ampollas o vesículas de la membrana externa [por ejemplo referencias 177 a 182, etc.] de *N. meningitidis* del serogrupo B [175]. Estas pueden prepararse a partir de bacterias que se han manipulado por ingeniería genética [183-186], por ejemplo, para aumentar la inmunogenicidad (por ejemplo hiperexpresar inmunógenos), para reducir la toxicidad, para inhibir la síntesis de polisacáridos capsulares, para regular por disminución la expresión de PorA, etc. Pueden prepararse a partir de cepas con hiperformación de ampollas [187-190]. Se pueden incluir vesículas de una *Neisseria* no patógena [191]. Las VME pueden prepararse sin el uso de detergentes [192,193]. Pueden expresar proteínas que no sean de *Neisseria* en su superficie [194]. Pueden no tener LPS. Pueden mezclarse con antígenos recombinantes [177, 195]. Pueden usarse vesículas de bacterias con diferentes subtipos de proteínas de membrana externa de clase I, por ejemplo, seis subtipos diferentes [196,197] usando dos poblaciones de vesículas diferentes modificadas por ingeniería genética, mostrando cada una tres subtipos, o nueve subtipos diferentes usando tres poblaciones de vesículas diferentes modificadas por ingeniería genética, mostrando cada una tres subtipos, etc.. Los subtipos útiles incluyen: P1.7, 16; P1.5-1,2-2; P1.19, 15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2, 4; P1.22, 14; P41.7-1,1; 30 P1.18-1,3, 6.

También es posible, por supuesto, complementar preparaciones de vesículas con dos o tres familias diferentes.

Expresión de proteínas

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

55 Las secuencias que codifican enzimas de la ruta metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas del metabolismo del azúcar, tales como galactosa, lactosa (*lac*) [Chang y col (1977) Nature 198:1056], y maltosa. Ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (*trp*) [Goeddel y col (1980) Nuc. Acids, Res. 8:4057; Yelverton y col., (1981) Nucl. Acid. Res. 9:731; Patente de Estados Unidos 4.738.921; documento EP-A-0036776 y documento EP-A-0121775]. El sistema promotor de la β -lactamasa (*bla*) [Weissmann (1981) "The

cloning of interferon and other mistakes." In Interferon 3 (ed. I. Gresser)], los sistemas promotores del bacteriófago lambda PL [Shimatake y col. (1981) Nature 292:128] y T5 [Patente de Estados Unidos 4.689.406] también proporcionan secuencias promotoras útiles. Otro promotor de interés es un promotor de arabinosa inducible (pBAD).

5 Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o de bacteriófago pueden unirse con secuencias operones de otro promotor bacteriano o de bacteriófago, lo que crea un promotor híbrido sintético [Patente de Estados Unidos 4.551.433]. Por ejemplo, el promotor *tac* es un promotor *trp-lac* híbrido compuesto por el promotor *trp* y las secuencias del operón *lac*, que está regulado por el represor *lac* [Amann y col (1983) Gene 25:167; de Boer y col (1983) Proc. Natl. Sci 80:21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores naturales de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unir la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor natural de origen no bacteriano también puede acoplarse a una ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema ARN polimerasa del bacteriófago T7/promotor es un ejemplo de un sistema promotor acoplado. [Studier y col., (1986) J. Mol Biol 189:113; Tabor y col., (1985) Proc Natl. Acad. Sci. 82:1074]. Además, un promotor híbrido también puede comprender un promotor de bacteriófago y una región *operador de E. coli* (EPO-A-0 267 851).

20 Además de una secuencia promotora en funcionamiento, para la expresión de genes extraños en procariontes es también útil un sitio de unión eficaz al ribosoma. En *E. coli*, el sitio de unión al ribosoma se denomina secuencia de Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio [Shine y col. (1975) Nature 254: 34]. Se piensa que la secuencia SD promueve la unión del ARNm al ribosoma mediante la formación de pares de bases entre la secuencia SD y el extremo 3' y del ARNr 16S de *E. coli* [Steitz y col. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA". In Biological Regulation and Development. Gene Expression (ed. R.F. Goldberger)]. Para expresar genes eucariotes y genes procariontes con un sitio de unión a ribosoma débil [Sambrook y col., (1989) "Expression of cloned genes in Escherichia coli". In Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

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

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

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

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

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

Como alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente pueden introducirse en vectores de transformación. Los vectores de transformación normalmente comprenden un marcador de selección que se mantiene en un replicón o se desarrolla en un vector de integración, como se han descrito anteriormente.

5 La vectores de expresión y de transformación, bien replicones extracromosómicos o vectores de integración, se han desarrollado para la transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* [Palva y col., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582; documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake y col., (1981) Nature 292: 128; Amann y col., (1985) Gene 40: 183; Studier y col., (1986) J. Mol. Biol. 189: 113; documentos EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 y EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655]; *Streptococcus lividans* [Powell y col., (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655], *Streptomyces lividans* [Patente de Estados Unidos 4.745.056].

15 Los procedimientos para inducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos son bien conocidos en la técnica y normalmente incluyen la transformación de bacterias tratadas con CaCl_2 u otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. El ADN también puede introducirse en las células bacterianas por electroporación. Los procedimientos de transformación normalmente varían con la especie bacteriana que se va a transformar. Véase, por ejemplo, [Masson y col., (1989) FEMSMicrobiol. Lett. 60: 273; Palva y col., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582; documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; WO 84/04541, Bacillus], [Miller y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang y col., (1990) J. Bacteriol. 172: 949, Campylobacter], [Cohen y col. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2110; Dower y col. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of Escherichia coli with ColEI-derived plasmids. In Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W. Boyer y S. Nicosia); Mandel y col. (1970) J. Mol. Biol. 53: 159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949: 318; Escherichia], [Chassy y col. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44: 173 Lactobacillus]; [Fiedler y col. (1988) Anal. Biochem 170: 38, Pseudomonas]; [Augustin y col., (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66: 203, Staphylococcus], [Barany y col. (1980) J. Bacteriol. 144: 698; Harlander (1987) "Transformation of Streptococcus lactis by electroporation, in: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti y R. Curtiss III); Perry y col., (1981) Infect. Immun. 32: 1295; Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655; Somkuti y col. (1987) Proc. 4^a Evr. Cong. Biotechnology 1:412, Streptococcus].

General

30 La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo una composición que comprende X puede consistir solo en X o puede incluir algo adicional por ejemplo X + Y.

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

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

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

40 Después del serogrupo, la clasificación de meningococos incluye el serotipo, el serosubtipo y, después, el inmunotipo y la nomenclatura convencional enumera serogrupo, serotipo, serosubtipo e inmunotipo, cada uno separado por dos puntos, por ejemplo B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes producen enfermedad a menudo (hiperinvásiva), algunos linajes producen más formas graves de la enfermedad que otros (hipervirulentos) y otros rara vez producen enfermedad. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, en concreto los subgrupos I, III y IV-1, el complejo ET-5, el complejo ET-37, el grupo A4 y el linaje 3. Estos se han definido por electroforesis enzimática de multilocus (EEML), pero también se ha usado la tipificación de secuencias en multilocus (TSMML) para clasificar los meningococos [ref. 10]. Los cuatro grupos hipervirulentos principales son los complejos ST32, ST44, ST8 y ST11.

50 El término "alquilo" se refiere a grupos alquilo tanto en formas lineales como ramificadas. El grupo alquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo también puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 enlaces dobles y/o triples. Sin embargo, el término "alquilo" normalmente se refiere a grupos alquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos o interrupciones de enlaces dobles o triples. Cuando se hace referencia a alquilo C_{1-12} , significa que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12}). De manera similar, cuando se hace referencia a alquilo C_{1-6} significa que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6).

55 El término "cicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, así como combinaciones de estos con grupos alquilo, tales como grupos cicloalquilalquilo. El grupo cicloalquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- o -S-. Sin embargo, el término "cicloalquilo" normalmente se refiere a grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones de heteroátomo. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen

grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C₃₋₁₂, significa que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

5 El término "arilo" se refiere a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a arilo C₅₋₁₂, significa que el grupo arilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (por ejemplo C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

La expresión "arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos tales como bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

10 Los grupos protectores de nitrógeno incluyen grupos sililo (tales como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tales como ftalimidias, trifluoroacetamidias, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxi carbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tales como β-trimetilsililetanesulfonil (SES)), derivados de sulfenilo, C₁₋₁₂ alquilo, bencilo, bencidrililo, trilito, 9-fenilfluorenilo, etc. Un grupo protector de nitrógeno preferido es Fmoc.

15 En general, la invención no incluye las diversas secuencias de NMB1870 divulgadas especialmente en las referencias 3, 5, 6 y 7 aunque estas secuencias de NMB1870 pueden usarse de acuerdo con la invención, por ejemplo, para la construcción de secuencias químicas, etc.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 a 6 muestran modelos 3D de NMB1870. La Figura 7 muestra la transferencia de bucles de superficie para NMB1870.

20 La Figura 8 muestra el mapeo epitópico PepScan de 12 oligómeros de una proteína NMB1870 de la familia I. Los 3 paneles de arriba a abajo son los resultados utilizando antisuero generado contra las familias I, II y III de NMB1870. Los resultados son en unidades de tinción arbitrarias.

La Figura 9 muestra una transferencia de Western de fragmentos de NMB1870, teñidos usando suero policlonal.

25 La Figura 10 muestra análisis FACS usando antisuero generado contra diferentes fragmentos de NMB1870.

La Figura 11 muestra una transferencia de Western de cepas en la familia I, II o III de NMB1870, teñidas con anticuerpo monoclonal mAb502 (transferencia izquierda) o con un suero policlonal anti-NMB1870 (transferencia derecha).

La Figura 12 muestra una transferencia de Western de fragmentos de NMB1870, teñidos usando mAb502.

30 La Figura 13 muestra una transferencia puntual de fragmentos de NMB1870, teñidos usando mAb502. Los dominios A a C se ensayaron individualmente. También se ensayó un fragmento del dominio B-C, así como una mezcla de dominios B y C.

35 Las Figuras 14 y 15 muestran análisis FACS de bacterias. Las tres filas se tiñeron con diferentes anticuerpos: parte superior = mAb502; parte central = suero policlonal; parte inferior = anticuerpo monoclonal contra sacáridos capsulares (control positivo, SEAM3). Las tres columnas en la Figura 14 son todas las cepas de la familia I: MC58, M2934 y BZ83. Las tres columnas en la Figura 15 no expresan la genosupresión isogénica de la cepa MC58 de NMB1870: ΔNMB1870 de la familia I; la cepa 961-5945 de la familia II; la cepa M1239 de la familia III.

40 La Figura 16 muestra la hidrofilia y análisis de estructura secundaria de la secuencia NMB1870_{MC58} (SEC ID N°: 1) de los restos 120 a 274.

Modos para realizar la invención

Mapeo epitópico

45 Para realizar el mapeo epitópico 'PepScan' se usaron fragmentos de 12 y 10 oligómeros de NMB1870_{MC58}. Los fragmentos se inmovilizaron en una membrana de celulosa y se hicieron reaccionar con antisueros generados contra una cepa de cada una de las tres familias de NMB1870: (I) MC58; (II) 2996; y (III) M1239. Los resultados del análisis de los 12 oligómeros se muestran en la Figura 8.

50 La región que incluye aproximadamente los primeros 110 aminoácidos de NMB1870 contiene epítopes lineales que son comunes a las tres familias. Los restos 120-183 incluyen epítopes específicos de familia. No se observaron péptidos positivos adicionalmente cadena abajo, lo que sugiere que estas secuencias están ocultas en la estructura tridimensional de la proteína y por tanto no podrían suscitar ningún anticuerpo en el suero, o que aquí los epítopes son discontinuos y no se observan en el análisis 'PepScan'. Las siguientes alineaciones muestran las regiones de la

secuencia NMB1870_{MC58} (SEC ID N°: 1) que reaccionan con cada antisuero:

- (1) Anti-MC58 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGL
 (2) Anti-2996 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGL
 (3) Anti-M1239 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGL
- 5 (1) Anti-MC58 QSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQ
 (2) Anti-2996 QSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQ
 (3) Anti-M1239 QSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQ
- 10 (1) Anti-MC58 IEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRI
 (2) Anti-2996 IEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRI
 (3) Anti-M1239 IEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRI
- (1) Anti-MC58 GDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKI
 (2) Anti-2996 GDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKI
 (3) Anti-M1239 GDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKI
- 15 (1) Anti-MC58 EHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKA
 (2) Anti-2996 EHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKA
 (3) Anti-M1239 EHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKA
- (1) Anti-MC58 QEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ
 (2) Anti-2996 QEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ
 (3) Anti-M1239 QEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ
- 20 Los epítomos comunes de las tres familias son por tanto DKGLQSLTLDQSVR (SEC ID N°: 21) y FDFIRQIEVDGQLI (SEC ID N°: 22).

Basándose en los resultados del mapeo epitópico, la secuencia NMB1870 se escindió en tres dominios teóricos:

(A) Aminoácidos 1-119 (SEC ID N°: 4)

25 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKL
 KLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYK

(B) Aminoácidos 120-184 (SEC ID N°: 5)

QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGG

(C) Aminoácidos 185-274 (SEC ID N°: 6)

30 KLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGG KAQEVAG
 SAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

Estos dominios se expresaron individualmente como proteínas que comprendían los dominios A, B o C (SEC ID Nos: 4 a 6) y en conjunto como proteínas que comprendían A-B (SEC ID N°: 23) o B-C (SEC ID N°: 24).

Durante la construcción de estas proteínas se usaron los siguientes cebadores oligonucleotídicos, y se introdujeron los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*:

Proteína	Cebador SEC ID Nos: (directo e inverso)
(A)	25 y 26
(B)	27 y 28
(C)	29 y 30
(A)(B)	31 y 32
(B)(C)	33 y 34

35 En la Figura 9 se muestra una transferencia de Western de los dominios A (truncados para comenzar con VAA...), B y C, usando anti-NMB1870_{MC58} policlonal como marcador. También se incluyen las fusiones AB y BC. El carril final de la transferencia contiene la proteína de longitud completa.

Los antisueros contra cada uno de los dominios A, B y C fueron capaces de unirse a células completas en análisis FACS (Figura 10). El cambio de fluorescencia fue más fuerte con los dominios A y C, lo que sugería que pueden ser

más inmunoacesibles. Ningún antisuero pudo reconocer una cepa Δ NMB1870 genosuprimida.

Los sueros suscitados en ratones contra las proteínas (y contra las proteínas de control) usando, como adyuvante, CFA o un hidróxido de aluminio (HA), y los resultados de los ABS contra tres cepas meningocócicas diferentes fueron los siguientes:

Proteína	MC58 ^{FAMILIA I} B:15:P1.7,16b (ET5)		961-5945 ^{FAMILIA II} B:2b: P1.21,16 (A4)		M1239 ^{FAMILIA III} B:14:P123,14 (lin.3)	
	CFA	HA	CFA	HA	CFA	HA
A	<4	16	<4	<4	<4	<4
B	<4	<4	<4	<4	<4	256
C	<4	512	<4	<4	<4	<4
AB	<4	<4	256	256	<4	<4
BC	32768	8192	<4	<4	<4	<4
SEC ID N° 1	524288	16384	2048	<8	<4	<4
SEC ID N° 2	<4	<4	16384	2048	<4	128
SEC ID N° 3	<4	<4	2048	1024	16384	4096

- 5 Por tanto, dentro de la SEC ID N°: 1 (MC58), los epítopes bactericidas más importantes requieren la presencia de los dominios B y C (dominio BC). Esto sugiere que la proteína puede incluir epítopes discontinuos constituidos por secuencias de estos dos dominios [ver ref. 237].

Además, los anticuerpos monoclonales Jar1, Jar3 y Jar4, que son capaces de proteger pasivamente a ratas contra infección meningocócica, reconocen el dominio BC pero no reconocen el dominio B o el dominio C en solitario. De manera similar, Jar5 reconoce el dominio AB, pero no el dominio A o el dominio B en solitario.

10

En la referencia 238 pueden encontrarse detalles adicionales de este trabajo.

Anticuerpo monoclonal 502

15 Para seleccionar anticuerpos monoclonales anti-NMB1870 con actividad bactericida, ratones CD1 se inmunizaron con la familia I NMB1870_{MC58}. Los sueros policlonales de los ratones individuales se evaluaron para detectar la unión de anticuerpos por ELISA sobre la proteína purificada y en células MC58 completas, y para la actividad bactericida mediada por complemento contra MC58. En base a estos resultados se seleccionó el bazo de un ratón alto respondedor para la fusión con células de mieloma. Se aislaron diversas líneas celulares de hibridoma productoras de anticuerpos y se seleccionaron por ELISA positivo contra la proteína purificada o contra células bacterianas completas MC58. Para estudios posteriores se seleccionó el MAb502, un anticuerpo monoclonal del isotipo IgG2a bactericida contra la cepa MC58. El anticuerpo reconoció la proteína purificada por ELISA y fue positivo en análisis FACS en la cepa MC58.

20

25 Un análisis de transferencia de Western contra NMB1870 de cada una de las tres variantes confirmó que el mAb502 reconocía un epítipo presente sólo en las secuencias de la familia I. En cambio, el suero policlonal reconoció las tres variantes. Se usó el anticuerpo mAb502 monoclonal en análisis FACS contra diversas cepas de la familia I. En cada caso el anticuerpo reconoció los antígenos de superficie celular (Figura 14, fila superior). El cambio de fluorescencia no fue tan fuerte como cuando se usaba un anti-NMB1870 policlonal (fila central) o cuando se usaba un SEAM3 monoclonal anti-cápsula (fila inferior), pero la unión fue específica. En cambio, el mAb502 no reconoció una cepa genosuprimida Δ NMB1870 (Figura 15, columna izquierda) y no reconoció las cepas de la familia II o familia III (columnas central y derecha). El control positivo anti-cápsula reconoció todas las cepas no reconocidas (Figura 30 15, fila inferior).

30

Comparación de inmunogenicidad de dominios

5 Los dominios A, B y C de la secuencia NMB1870-MC58ΔG (familia I) se prepararon individualmente y como fusiones de AB y BC, todos con marcadores de His en el extremo C. Estos se usaron para inmunizar ratones y los sueros se ensayaron para determinar la actividad bactericida contra una cepa de cada familia NMB1870. Por comparación, también se ensayaron los sueros suscitados en respuesta a las secuencias ΔG-NMB1870 de las tres familias. Como adyuvantes para las proteínas se usó hidróxido de aluminio o FCA. Los resultados fueron estos:

		MC58 B:15:P1.7,16b	961-5945 B:2b:P1.21,16	M1239 B:14:P1.23,14
	Adyuvante	ET5	A4	lin.3
A	FCA	<4	<4	<4
A	HA	16	<4	<4
B	FCA	<4	<4	<4
B	HA	<4	<4	256
C	FCA	<4	<4	<4
C	HA	512	<4	<4
AB	FCA	<4	256	<4
AB	HA	<4	256	<4
BC	FCA	32768	<4	<4
BC	HA	8192	<4	<4
MC58	FCA	524288	2048	<4
MC58	HA	16384	<8	<4
2996	FCA	<4	16384	<4
2996	HA	<4	2048	128
M1239	FCA	<4	2048	16384
M1239	HA	<4	1024	4096

Por tanto, los dominios individuales no son inmunógenos particularmente eficaces, el dominio AB tampoco es particularmente eficaz, si bien, el dominio BC mostró buena actividad.

Modelo 3D del dominio BC

10 Se obtuvo una predicción de la estructura super-secundaria del dominio BC sometiendo la secuencia MC58 al servidor HMMSTR/Rosetta [240]. El resultado se muestra en la Figura 1.

La estructura 3D se sometió a exploración VAST [241] para encontrar similitud con estructuras de proteínas resueltas y para refinar los bucles. El resultado VAST (Figura 2) fue:

15 NMB1870 RHAVISGSVLYNQa--EKGSYS1g----iFGGKa QEVA
1K32_A 311 IAFVSRGQAFIQDvsgTYVI,KVpeplirYVRRggdtkvAFIH 353

Usando el resultado VAST, el fragmento 229-259 (parte superior derecha de la Figura 2) se modeló adicionalmente y se modificó introduciendo giros en la estructura a lo largo de la línea de puntos de la Figura 2. El modelo resultante se refinó por minimización de energía, para proporcionar el modelo final de la Figura 3.

En la Figura 6 se muestra este modelo poniendo de relieve los bucles superficiales.

20 **Mapeo epitópico de superficie**

Un alineamiento de secuencia múltiple de los dominios de BC de las secuencias de NMB1870 a partir de cepas reconocidas por mAb502 en las transferencias de Western reveló diversa información de secuencia. Todas las cepas que estaban unidas por el anticuerpo incluían el resto Arg223, pero este resto era His en las cepas que no se

reconocían en las transferencias. Aún así, no todas las secuencias con Arg223 produjeron sueros bactericidas y por eso el epítipo bactericida total debe ser más amplio que este resto individual.

El alineamiento identificó otros restos que podrían estar implicados en la formación de un epítipo bactericida específico: Phe128 (F), Ile133 (I), Asn197 (N), Gly221 (G), Lys249 (K), Lys260 (K) y Val262 (V). Todos estos aminoácidos (fondo gris debajo) se conservan perfectamente entre las cepas ET-5 (tales como MC58), que son positivas a BCA, pero difieren en las cepas que son negativas a BCA:

```

mc58      KQSHSALTALQTEQVODSEHSGKMVAK
f6124    KQSHSALTALQTEQVODSEHSGKMVAK
m198172  KQSHSALTALQTEQVODSEHSGKMVAK
m4030    KQSHSALTALQTEQVODSEHSGKMVAK
    
```

```

mc58      RQFRIGDIAGEHTSFDKLEEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKC
f6124    RQFRIGDIAGEHTSFDKLEEGGRATYRGTAFGSDDASGKLYTIDFAAKC
m198172  RQFRIGDIAGEHTSFDKLEEGGRATYRGTAFGSDDASGKLYTIDFAAKC
m4030    RQFRIGDIAGEHTSFDKLEKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKC
    
```

```

mc58      GNGKIEHLKSPENVDLAAADIKPKDKRHAVISGSVLYNQAERKGSYSLGI
f6124    GHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPKDKRHAVISGSVLYNQAERKGSYSLGI
m198172  GNGKIEHLKSPENVDLAAADIKPKDKRHAVISGSVLYNQAERKGSYSLGI
m4030    GIGKIEHLKSPENVDLAAATAYIKPDKRHAVISGSVLYNQAERKGSYSLGI
    
```

```

mc58      FCGQAQEVAGSAEVEITANGIHHIGLAAKC
f6124    FCGQAQEVAGSAEVEITANGIHHIGLAAKC
m198172  FCGQAQEVAGSAEVEITANGIHHIGLAAKC
m4030    FCGQAQEVAGSAEVEITANGIHHIGLAAKC
    
```

Estudios similares basados en el alineamiento de secuencias de cepas que reaccionan con un suero policlonal bactericida identificaron los siguientes restos: Phe128, Ile133, Asn197 y Gly221. Los restos Lys249, Lys260 y Va1262, identificados por el anticuerpo monoclonal, se descartaron en esta fase y estos tres restos se conservaron en la secuencia de NMB1870 de una cepa negativa a BCA (M2197).

A partir del modelo 3D de NMB1870, se observa que Phe134 e Ile139 se encuentran dentro de una supuesta hélice alfa, y por lo tanto no están bien accesibles para los anticuerpos. Por otro lado, tanto Asn197 como Gly221 están incluidos dentro de bucles de superficie y bien expuestos. Tanto Gly221 como Asn197 están espacialmente próximos a Arg223, y por tanto pueden formar parte del mismo epítipo. Considerando Gly221, cepas negativas a BCA a menudo tienen este pequeño y neutro aminoácido sustituido con un resto Glu o Lys, ambos voluminosos y con carga. Esta sustitución podría perjudicar al reconocimiento y unión correctos de anticuerpos a este epítipo.

Este análisis por tanto revela cinco aminoácidos clave: Phe128, Ile133, Asn197, Gly221 y Arg223. Cuando se realiza un mapeo de estos restos con el modelo 3D (Figura 4), tres de ellos se agrupan en la superficie de la proteína (Figura 5). El alineamiento con una predicción estructural secundaria (Figura 16) también muestra que Ile133, Asn197, Gly221 y Arg223 se localizan en regiones hidrófilas (es decir, en bucles de superficie).

Otros restos importantes podrían ser el dipéptido AD en posición 215-216, que está sustituido en la mayoría de las cepas negativas a BCA por AY y por S D en algunos respondedores débiles.

Los aminoácidos 197, 221 y 223 se mutaron de la siguiente manera:

Aminoácido (s) original	Asn-197	Gly-221	Arg-223	Asn-197 & Gly-221
Sustitución (s)	His	Lys	His	His y Lys

La mutagénesis utilizó el sistema SDM de GeneTailor™ de Invitrogen. Se diseñaron cebadores internos que contenían cambios de codón de acuerdo con las especificaciones del manual de instrucciones y fueron los siguientes:

Cebadores	Secuencias (SEC ID N°:)	Mutación
741(1)-N197H dir 741(1)-N197H inv	GATTTCCGCCGCAAGCAGGGAcACGGCAAATCGAA (SEC ID N°: 66) TCCCTGCTTGCGGCGAAATCTATGGTGTAGGT (SEC ID N°: 67)	AAC → cAC N → H
741(1)-G221K dir 741(1)-G221K inv	GCCGCCGATATCAAGCCGGATaaAAAACGCCATGCC (SEQ ID N°: 68) ATCCGGCTTGATATCGGCGGCGGCCAGGTCGAC (SEQ ID N°: 69)	GGA → aaA G → K
741(1)-R223H dir 741(1)-R223H inv	GATATCAAGCCGGATGGAAAACaCCATGCCGTCATCAGC (SEQ ID N°: 70) TTTCCATCCGGCTTGATATCGGCGGCGGCCAGGTC (SEQ ID N°: 71)	CGC → CaC R → H

5 Para generar cada mutante, se usaron, como molde, 100 ng de ADN del plásmido pET- Δ G741₍₁₎-His en una reacción de metilación, después, como sustrato, se emplearon 12,5 ng de plásmido metilado en una reacción de mutagénesis, usando los siguientes pares de cebadores:

741(1)-N197H dir / 741(1)-N197H inv

741(1)-G221K dir / 741(1)-G221K inv

741(1)-R223H dir / 741(1)-R223H inv

10 Se realizó PCR de acuerdo con el manual de instrucciones del sistema de mutagénesis dirigida a sitio de GeneTailor™. Después de la reacción, se analizaron 10 μ l del producto en un gel de agarosa al 1%, después 2 μ l de mezcla de reacción de mutagénesis se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5a™-T1^R de acuerdo con las especificaciones del manual. Se analizaron colonias positivas por aislamiento de plásmidos (Kil QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN™) y secuenciación. Para generar el doble mutante Δ G741₍₁₎-His-N197H-G221K, se usó el ADN del mutante positivo Δ G741 (1)-His-G221K como sustrato para el siguiente con el par de cebadores correspondiente

15 741₍₁₎-N197H dir/741₍₁₎-N197H rev.

20 Para la expresión de la proteína recombinante como una fusión marcador-His-extremo C, se usaron 1,5 μ l de cada construcción para transformar la cepa BL21-DE₃ de *E. coli*. Se inocularon colonias recombinantes individuales en 4 ml de LB + Amp (100 μ g/ml), se incubó a 37 °C durante una noche, después se diluyó a 1:30 en 20 ml de LB + Amp (100 μ g/ml) en matraces de 125 ml, para proporcionar una DO_{600nm} entre 0,1 y 0,2. Los matraces se incubaron a 37 °C en un agitador de baño de agua giratorio hasta crecimiento exponencial indicado a una DO_{600nm} adecuado para la inducción de la expresión (DO 0,4-0,8). Se indujo la expresión de proteínas añadiendo IPTG 1,0 mM. Después de 3 horas de incubación a 37 °C se midió la DO_{600nm} y se examinó la expresión. Se centrifugaron 1,0 ml de cada muestra en una microcentrifugadora, el sedimento se resuspendió en PBS y se analizó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Se expresaron todos los mutantes y no mutantes y se purificaron como formas solubles a 37 °C.

25 **Sustitución de bucle**

Basándose en el modelo 3D y en el trabajo de mapeo epitópico, los bucles de superficie de la familia II y III de NMB1870 se transfirieron a un armazón de la familia I.

30 Para el Bucle 1, la secuencia de aminoácidos está 100% conservada entre todas las cepas de la familia II y familia III. En las tres familias, el Bucle 1 está flanqueado por dos hélices alfa (no conservadas en la secuencia) que posiblemente contribuyen a la exposición/plegamiento correcto del bucle. El resto Gly140 no se encuentra en la secuencia M6190 de la familia I, y aunque los anticuerpos Jar3 y Jar5 monoclonales se unen a las secuencias de la familia I no se unen a M6190, confirmando posteriormente la importancia epitópica de este bucle. La secuencia de la familia II se seleccionó para la inserción en el armazón de la familia I.

35 El Bucle 2 corresponde a un epítipo bactericida. La única diferencia entre las familias II y III en esta posición es una sustitución Asp/Gly. Análisis de respuestas bactericidas entre las cepas de la familia II sugieren una función crítica para el resto Asp, de manera que se seleccionó la secuencia de la familia II.

40 El Bucle 3 es muy variable dentro de las familias II y III, pero se conserva en la familia I. En familia II, la mayor parte de las cepas tiene la secuencia PNG, pero en familia III la mayoría tiene la secuencia AGG. Aunque este bucle parece ser dispensable para la protección (las cepas con PNG son capaces de proteger contra las cepas con AGG de la familia III), para incluir ambas posibilidades la secuencia AG de la familia I se sustituyó con PN.

El resto Asn197 en el bucle 4 se identificó previamente como un resto importante para diferenciar entre cepas positivas a BCA y negativas a BCA de la familia I, y siempre se conservó en las cepas ET-5. El resto está sustituido por His en todas las cepas de la familia II y en un subgrupo de cepas de la familia III. Además, His también está

presente en algunas cepas de la familia I. His se usó por tanto en este bucle, para incluir las familias II y III, además de cualquier secuencia de la familia I no incluida en la secuencia MC58.

5 El bucle 5, bucle 6 y bucle 7 son iguales en las familias II y III, pero diferentes de los de la familia I. Para estos tres bucles se usaron las secuencias de la familia II/III. El segundo resto en el bucle es Gly en lugar de Val porque las cepas de la familia II que son susceptibles a suero suscitado contra la proteína de la cepa 2996 tienen este resto en esa posición.

10 Las sustituciones para cambiar la SEC ID N°: 1 en la SEC ID N°: 61, se muestran en la Figura 7. Los bucles 1, 2 y 4 recibieron secuencias de la familia II; el bucle 3 recibió la secuencia de la familia III; y los bucles 5, 6 y 7 recibieron una secuencia común a ambas familias II y III. Con 28 sustituciones de 274 (SEC ID N°: 1) y 273 (SEC ID N°: 61) aminoácidos en total, la identidad global después del cambio de bucle superficial continuó siendo > 90%.

Los bucles se sustituyeron en serie. Se constituyeron siete proteínas en esta serie, sustituyendo cada bucle de la secuencia ΔGNMB1870_{MC58} en orden. Las siete proteínas sustituidas se denominaron LP₁, LP₂,..., LP₇. El mutante LP₇ es la SEC ID N°: 61.

Para este trabajo se usó el sistema SDM de GeneTailor™ (véase anteriormente), con los siguientes cebadores:

Cebadores	Secuencias	SEC ID N°
741 (1)-LP1 dir	GCCTTTCAGACCGAGCAAATAaAcaAccCGGAcaAaatCGacAgcATGGTTGCGAAACGC	72
741 (1)-LP1 inv	TATTTGCTCGGTCTGAAAGGCGGTTAAGGCGGA	73
741 (1)-LP2 dir	GCGAACATACATCTTTTGACcAGCTTCCCGAcGGCaaaAGGGCGACATATCGC	74
741 (1)-LP2 inv	GTCAAAGATGTATGTTCCGCCGCTATGTGCC	75
741 (1)-LP3 dir	ACGGCGTTCGGTTCAGACGATcCgaaCGGAAAACCTGACCTAC	76
741 (1)-LP3 inv	ATCGTCTGAACCGAACGCCGTCCCGCATATGTCCG	77
741 (1)-LP4 dir	GATTCGCCGCCAAGCAGGGAcACGGCAAAATCGAA	78
741 (1)-LP4 inv	TCCCTGCTTGGCGGCGAAATCTATGGTGTAGGT	79
741 (1)-LP5 dir	CTGGCCGCCGCCGATATCAAGgCcGATGaAAAAaGCCATGCCGTCATC	80
741 (1)-LP5 inv	CTTGATATCGGCGGCGGCCAGGTCGACATTGAG	81

(continuación)

Cebadores	Secuencias	SEC ID Nº
741 (1)-LP6 dir	ATCAGCGGTTCCGTCCTTTAC ggCagcGaa GAGAAAGGCAGT	82
741 (1)-LP6 inv	GTAAAGGACGGAACCGCTGATGACGGCATGGCG	14
741 (1)-LP7 dir	GCCGGCAGCGCGGAAGTGAAA AtCGgcgAaaaggTACaCgAa ATCGGCCTTGCCGCC	15
741 (1)-LP7 inv	TTTCACTTCCGCGCTGCCGGCAACTTCTGGGCTTT	16

5 Todas las proteínas se expresaron así como la proteína de tipo silvestre y pudieron purificarse como productos solubles después del crecimiento a 37 °C. Se usaron las proteínas LP₁, LP₂,..., LP₇ para inmunizar a los ratones, y los sueros resultantes se sometieron a ensayo contra diversas cepas diferentes de meningococo del serogrupo B, incluyendo al menos tres de cada familia de NMB1870. La proteína de partida (LP0) también se ensayó. Como adyuvante para las proteínas se usó hidróxido de aluminio (HA) o FCA (F). En la siguiente tabla, cada fila (excepto la fila inferior) muestra los ABS para un solo suero, ensayado contra nueve cepas ejemplares. La fila inferior muestra la actividad de un suero obtenido usando el antígeno de tipo silvestre a partir del homólogo de NMB1870 (es decir, ensayando con suero anti-NMB1870_{MC58} contra MC58, etc.):

Proteína	Adyuvante	MC58	NZ 98/254	M4030	2996	961-5945	M2552	M1239	6B364	GB988
		ET5	Lin.3	otra	A4	A4	otra	Lin.3	ET37	otra
		B:15:P1.7,16b	B:4:P1.4	B:17:P1.19,15	B:2W>1.5,2	B:2b:P1.21,16	B	B:14:P1.23,14	B:2a:P1.5,2	B:1:P1.22,14
		Familia I NMB1870			Familia II NMB1870			Familia III NMB1870		
LP0	F	16384	<16	4096	64	128	<16	<16	256*	<16
LP0	HA	8192	<16	256	<4	64	<16	<16	<16	<16
LP1	F	32768	256	8192	<4	512	128	<16	512	<16
LP1	HA	8192	64	2048	<4	1024	128	<16	256	<16
LP2	F	16384	<16	4096	256	2048	256*	<16	2048	<16
LP2	HA	4096	128	1024	128*	4096	128	<16	512	<16
LP3	F	65536	512	4096	256	4096		<16	1024	256
LP3	HA	16384	256	1024	<16	128		<16	256	64
LP4	F	65536	2048	8192	128*	2048		<16	1024	1024
LP4	HA	16384	256	256	<16	64		<16	128	128
Hom	HA	16384	64	2048	1024	2048	128	16384	1024	2048

* = el suero fue bacteriostático

10 Avanzando desde LP0 (sin sustituciones; NMB1870; familia I) a LP7 a través de LP1, LP2, etc., los sueros suscitados contra la proteína se vuelven más activos contra cepas cuya NMB1870 está en la familia II o familia III. Dado que las secuencias de la familia I se sustituyen con secuencias de la familia II/III entonces, a diferencia de expectativas anteriores, las respuestas bactericidas contra las cepas de la familia I muestran una tendencia ascendente.

15 Por tanto la SEC ID Nº 61 contiene epítopes de superficie de las familias II y III, para sustituir epítopes de la familia I. El polipéptido quimérico puede usarse para suscitar anticuerpos contra NMB1870 de las familias II y III y puede combinarse con una secuencia normal de la familia I para proporcionar antigenicidad multifamiliar. La combinación puede ser como una mezcla de dos polipéptidos individuales, o puede ser en forma de un híbrido [7] por ejemplo

NH₂-X₁- SEC: 61-X₂- SEC: 1-X₃- COOH, NH₂-X₁- SEC: 1-X₂- SEC: 61-X₃- COOH, etc.

Nuevas secuencias de NMB1870

Se dispone de amplia información de secuencias para NMB1870 [por ejemplo, refs. 3, 5, 6 y 7]. Se han descubierto nuevas secuencias de NMB1870 adicionales.

- 5 La secuencia para la cepa 4243 se proporciona como SEC ID N°: 62, comenzando en la cisteína N-terminal de la proteína madura. El péptido líder escindido es el mismo que el de una secuencia normal de la familia I.

En la cepa M.01.0240320 ('gb320'; SEC ID N°: 63) y en la cepa S10026 (SEC ID N°: 64) se ha observado una cuarta familia de NMB1870. La secuencia de m3813 (SEC ID N°: 21 de la ref. 7; SEC ID N°: 65 en el presente documento) también puede clasificarse en la familia IV.

10 Breve descripción del listado de secuencias

SEC ID N°:	Descripción
1	NMB 1870 de la cepa MC58 – familia I
2	NMB 1870 de las cepas 961-5945 y 2996 - familia II
3	NMB 1870 de la cepa M1239 – familia III
SEC ID N°:	Descripción
4-6	Dominios A a C de la SEC ID N°: 1
7-9	Dominios A a C de la SEC ID N°: 2
10-12	Dominios A a C de la SEC ID N°: 3
13	Dominio A maduro de SEC ID N°: 4
14-16	Cebadores de SDM
17-20	Engarces y secuencias de expresión
21-22	Epítopes comunes
23	AB
24	BC
25-42	Cebadores
43	B _{M1239} C _{MC58} M1239MC58
44	BC ₂₉₉₆ BC _{M1239} 2996M1239
45	Engarce
46-51	Cebadores
52	BC _{MC58} -BC _{M1239} .BC ₂₉₉₆ MC58 M1239 2996
53	NMB1870 _{MC58} -NMB1870 _{M1239} -NMB1870 ₂₉₉₆
54	Secuencia para la expresión
55-60	Cebadores
61	Sustitución de bucle superficial
62-65	Secuencias de NMB1870
66-82	Cebadores de SDM

REFERENCIAS

- [1] Jodar y col. (2002) Lancet 359(9316):1499-1508.
 [2] Documento WO99/57280.
 [3] Massignani y col. (2003) J Exp Med 197:789-799.
 [4] Pizza y col. (2000) Science 287:1816-1820.
 [5] Documento WO03/063766.
 [6] Fletcher y col. (2004) Infect Immun 72:2088-2100.

- [7] Documento WO2004/048404.
- [8] Achtman (1995) Global epidemiology of meningococcal disease. Páginas 159-175 of Meningococcal disease (ed. Cartwright). ISBN: 0-471-95259-1.
- 5 [9] Caugant (1998) APMIS 106:505-525.
- [10] Maiden y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3140-3145.
- [11] Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
- [12] Rice y col. (2000) Trends Genet 16:276-277.
- [13] Documento WO01/30390.
- 10 [14] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [15] Documento WO03/009869.
- [16] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [17] Documento WO00/23105.
- [18] Documento WO90/14837.
- 15 [19] Patente de Estados Unidos 5.057.540.
- [20] Documento WO96/33739.
- [21] Documento EP-A-0109942.
- [22] Documento WO96/11711.
- [23] Documento WO00/07621.
- 20 [24] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [25] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- [26] Niikura y col. (2002) Virology 293:273-280.
- [27] Lenz y col. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
- [28] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
- 25 [29] Gerber y col. (2001) Virol 75:4752-4760.
- [30] Documento WO03/024480
- [31] Documento WO03/024481
- [32] Gluck y col. (2002) Vaccine 20:B10-B16.
- [33] Documento EP-A-0689454.
- 30 [34] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [35] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- [36] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
- [37] Pajak y col. (2003) Vaccine 21:836-842.
- [38] Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.
- 35 [39] Documento WO02/26757.
- [40] Documento WO99/62923.
- [41] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
- [42] McCluskie y col. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.
- [43] Documento WO98/40100.
- 40 [44] Patente de Estados Unidos 6.207.646.
- [45] Patente de Estados Unidos 6.239.116.
- [46] Patente de Estados Unidos 6.429.199.
- [47] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
- [48] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- 45 [49] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
- [50] Documento WO01/95935.
- [51] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306:948-953.
- [52] Bhagat y col. (2003) BBRC 300:853-861.
- [53] Documento WO03/035836.
- 50 [54] Documento WO95/17211.
- [55] Documento WO98/42375.
- [56] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
- [57] Pizza y col. (2001) Vaccine 19:2534-2541.
- [58] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- 55 [59] Scharton-Kersten y col. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.
- [60] Ryan y col. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
- [61] Partidos y col. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
- [62] Peppoloni y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.
- [63] Pine y col. (2002) J Control Release 85:263-270.
- 60 [64] Domenighini y col. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
- [65] Documento WO99/40936.
- [66] Documento WO99/44636.
- [67] Singh y col] (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [68] Documento WO99/27960.
- 65 [69] Patente de Estados Unidos 6.090.406
- [70] Patente de Estados Unidos 5.916.588

- [71] Documento EP-A-0626169.
 [72] Documento WO99/52549.
 [73] Documento WO01/21207.
 [74] Documento WO01/21152.
 5 [75] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 [76] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
 [77] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
 [78] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
 [79] Documento WO99/11241.
 10 [80] Documento WO94/00153.
 [81] Documento WO98/57659.
 [82] Solicitud de Patente Europea 0835318, 0735898 y0761231.
 [83] Documento WO99/24578.
 [84] Documento WO99/36544.
 15 [85] Costantino y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
 [86] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
 [87] Documento WO03/007985.
 [88] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 [89] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
 20 [90] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
 [91] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
 [92] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
 [93] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
 [94] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 25 [95] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
 [96] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 [97] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 [98] Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 [99] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
 30 [100] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
 [101] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
 [102] Documento WO02/34771.
 [103] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 [104] Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 35 [105] Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véase las páginas 1218-1219.
 [106] Documento EP-A-0372501
 [107] Documento EP-A-0378881
 [108] Documento EP-A-0427347
 [109] Documento WO93/17712
 40 [110] Documento WO94/03208
 [111] Documento WO98/58668
 [112] Documento EP-A-0471177
 [113] Documento WO00/56360
 [114] Documento WO91/01146
 45 [115] Documento WO00/61761
 [116] Documento WO01/723 37
 [117] *Research Disclosure*, 453077 (ene 2002)
 [118] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
 [119] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
 50 [120] Documento WO03/080678.
 [121] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
 [122] Frash (1990) p.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
 [123] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
 [124] Kandil y col. (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
 55 [125] Berkin y col. (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
 [126] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
 [127] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
 [128] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
 [129] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
 60 [130] Patente Europea 0477508.
 [131] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
 [132] Documento WO98/42721.
 [133] Dick y col. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
 [134] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
 65 [135] Kanra y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.
 [136] Ravenscroft y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 35-47.

- [137] Documento WO97/00697.
 [138] Documento WO02/00249.
 [139] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
 [140] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
 5 [141] Tettelin y col. (2001) *Science* 293:498-506.
 [142] Hoskins y col (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.
 [143] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
 [144] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.
 [145] Masignani y col. (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
 10 [146] Mora y col. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
 [147] Wizemann y col. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
 [148] Rigden y col. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.
 [149] Documento WO02/22167.
 [150] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
 15 [151] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
 [152] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
 [153] Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
 [154] Documento EP-A-0594610.
 [155] Documento WO02/091998.
 20 [156] Documento WO99/42130
 [157] Documento WO96/40242
 [158] Lees y col. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
 [159] WO95/08348.
 [160] Patente de Estados Unidos 4.882.317
 25 [161] Patente de Estados Unidos 4.695.624
 [162] Porro y col. (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s
 [163] Documento EP-A-0208375
 [164] Documento WO00/10599
 [165] Gevertz y col. *Med. Microbiol. Immunol.* 165 : 171-288 (1979).
 30 [166] Patente de Estados Unidos 4,457,685.
 [167] Patente de Estados Unidos 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
 [168] Patente de Estados Unidos 4,459,286.
 [169] Patente de Estados Unidos 4,965,338
 [170] Patente de Estados Unidos 4,663,160.
 35 [171] Patente de Estados Unidos 4,761,283
 [172] Patente de Estados Unidos 4,356,170
 [173] Lei y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
 [174] Documento WO00/38711; Patente de Estados Unidos 6,146,902.
 [115] Documento WO02/09643.
 40 [176] Katial y col. (2002) *Infect Immun* 70:702-707.
 [177] Documento WO01/52885.
 [178] Patente europea 0301992.
 [179] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
 [180] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
 45 [181] Documento WO02/09746.
 [182] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
 [183] Documento WO01/09350.
 [184] Ppatente Europea 0449958.
 [185] Documento EP-A-0996712.
 50 [186] Documento EP-A-0680512.
 [187] Documento WO02/062378.
 [188] Documento WO99/59625.
 [189] Patente de Estados Unidos US 6,180,111.
 [190] Documento WO01/34642.
 55 [191] Documento WO03/051379.
 [192] Patente de Estados Unidos 6,558,677.
 [193] Documento WO2004/019977.
 [194] Documento WO02/062380.
 [195] Documento WO00/25811.
 60 [196] Peeters y col. (1996) *Vaccine* 14:1008-1015.
 [197] Vermont y col. (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.
 [198] Kabat y col., 1987, in *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA
 65 [199] Breedveld (2000) *Lancet* 355(9205):735-740.
 [200] Gorman & Clark (1990) *Semin, Immunol.* 2:457-466

- [201] Jones y col. (1986) Nature 321:522-525
 [202] Morrison y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81:6851-6855
 [203] Morrison & Oi, (1988) Adv. Immunol., 44:65-92.
 [204] Verhoeyer y col. (1988) Science 239:1534-36.
 5 [205] Padlan (1991) Molec. Immun. 28:489-98.
 [206] Padlan (1994) Molec. Immunol. 31:169-217.
 [207] Kettleborough y col. (1991) Protein Eng. 4:773-83.
 [208] Documento WO98/24893
 [209] Documento WO91/10741
 10 [210] Documento WO96/30498
 [211] Documento WO94/02602
 [212] Patente de Estados Unidos 5,939,598.
 [213] Conrath y col. (2003) Dev Comp Immunol 27:87-103.
 [214] Muyldermans (2001) J Biotechnol 74:277-302.
 15 [215] Huston y col. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883.
 [216] Patente de Estados Unidos 5,091,513
 [217] Patente de Estados Unidos 5,132,405
 [218] Patente de Estados Unidos 4,946,778
 [219] Pack y col., (1992) Biochem 31:1579-1584
 20 [220] Cumber y col. (1992) J. Immunology 149B:120-126
 [221] Radrizzani M y col., (1999) Medicina (B Aires) 59(6):753-8.
 [222] Radrizzani M y col. (2000) Medicina (B Aires) 60 Suppl 2:55-60.
 [223] Patente de Estados Unidos 4,011,308
 [224] Patente de Estados Unidos 4,722,890
 25 [225] Patente de Estados Unidos 4,016,043
 [226] Patente de Estados Unidos 3,876,504
 [227] Patente de Estados Unidos 3,770,380
 [228] Patente de Estados Unidos 4,372,745
 [229] Kohler & Milstein (1975) Nature 256:495-497
 30 [230] Inbar y col. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci USA 69:2659-2662
 [231] Hochman y col. (1976) Biochem 15:2706-2710
 [232] Ehrlich y col. (1980) Biochem 19:4091-4096
 [233] Siegel, Transfus. Clin. Biol. (2002) 9(1): 15-22;
 [234] Sidhu, Curr. Opin. Biotechnol. (2000) 11(6):610-616;
 35 [235] Sharon, y col., Comb. Chem. High Throughput Screen (2000) 3(3): 185-196;
 [236] Schmitz y col., Placenta, (2000) 21 Supp1A: S106-12
 [237] Bartoloni y col. (1988) Bio/technology 6:709-712.
 [238] Giuliani y col. (2005) Infect Immun 73:1151-60.
 [239] Documento WO2004/032958.
 40 [240] <http://www.bioinfo.rpi.edu/~bystrcl/hmmstr/sever.php>
 [241] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vast.shtml>

Listado de secuencias

SEC ID N°: 1 - cepa MC58 - familia I

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
 AKQCGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

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

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFA
 KQGHGKIEHLKTPQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N°: 3 - cepa M1239 - familia III

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNK
 NDKISRFDFVQKIEVDGQITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGL
 HYSIDFTKKQYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N°: 4 - dominio A de la SEC ID N°: 1

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYK

SEC ID N°: 5 - dominio B de la SEC ID N°: 1

QSHSALTAFAQTEQIQDSEHSKGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFIGSDDAGG

SEC ID N°: 6 - dominio C de la SEC ID N°: 1

5 KLTYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEV
KTVNGIRHIGLAAKQ

SEC ID N°: 7 - dominio A de la SEC ID N°: 2

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYK

SEC ID N°: 8 - dominio B de la SEC ID N°: 2

10 QDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGG

SEC ID N°: 9 - dominio C de la SEC ID N°: 2

KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLA-
LFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N°: 10 - dominio A de la SEC ID N°: 3

15 MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYK

SEC ID N°: 11 - dominio B de la SEC ID N°: 3

QNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG

SEC ID N°: 12 - dominio C de la SEC ID N°: 3

20 RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLA-
LFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N°: 13 - dominio A maduro de la SEC ID N°: 4

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYK

SEC ID N°: 14 - Cebador SDM

GTAAAGGACGGAACCGCTGATGACGGCATGGCG

SEC ID N°: 15 - cebador SDM

25 GCCGGCAGCGCGGAAGTAAAATCGGCGAAAAGGTACACGAAATCGGCCTTGCCGCC

SEC ID N°: 16 - Cebador SDM

TTTCACTTCCGCGCTGCCGGCAACTTCTGGGCTTT

SEC ID N°: 17

30 GSGGGG

SEC ID N°: 18

GGGG

SEC ID N°: 19 - Secuencia para la expresión

GSGPDSDRLLQRR

SEC ID N°: 20 - Secuencia para la expresión

35 GPDSDRLLQRR

SEC ID N°: 21 - epítotope común

DKGLQSLTLDQSVR

SEC ID N°: 22 - epítotope común

40 FDFIRQIEVDGQLI

SEC ID N°: 23 -AB

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGG

SEC ID Nº: 24 - BC

QSHSALTAFTQTEIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAA
 DIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSÆVKTVNGIRHIGLAAKQ

5 **SEC ID Nº: 25 - cebador oligonucleotídico**
 CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

SEC ID Nº: 26 - cebador oligonucleotídico
 CCCGCTCGAGTTGTTGTATACTTGGAECTCTCCAC

SEC ID Nº: 27 - cebador oligonucleotídico
 CGCGGATCCCATATGCAAAGCCATTCCGCCTTAA

10 **SEC ID Nº: 28 - cebador oligonucleotídico**
 CCCGCTCGAGTCCGCCGCATCGTCTG

SEC ID Nº: 29 - cebador oligonucleotídico
 CGCGGATCCCATATGGGAAAAGTACCTACACCA

15 **SEC ID Nº: 30 - cebador oligonucleotídico**
 CCCGCTCGAGTTGCTTGCGGCAAGGC

SEC ID Nº: 31 - cebador oligonucleotídico
 CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

SEC ID Nº: 32 - cebador oligonucleotídico
 CCCGCTCGAGTCCGCCGCATCGTCTG

20 **SEC ID Nº: 33 - cebador oligonucleotídico**
 CGCGGATCCCATATGCAAAGCCATTCCGCCTTAA

SEC ID Nº: 34 - cebador oligonucleotídico
 CCCGCTCGAGTTGCTTGCGGCAAGGC

25 **SEC ID Nº: 35 - cebador oligonucleotídico**
 CGCGGATCCCATATGCAGAACCACTCCGCCGT

SEC ID Nº: 36 - cebador oligonucleotídico
 GCCAAGCTTGCCATTCCGGTCGTCGG

SEC ID Nº: 37- cebador oligonucleotídico
 GCCAAGCTTAAACTGACCTACACCATAGA

30 **SEC ID Nº: 38 - cebador oligonucleotídico**
 CCCGCTCGAGTTGCTTGCGGCAAGGC

SEC ID Nº: 39 - cebador oligonucleotídico
 CGCGGATCCCATATGCAGGACCACTCCGCCG

35 **SEC ID Nº: 40 - cebador oligonucleotídico**
 CGCGGATCCCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID Nº: 41- cebador oligonucleotídico
 CGCGGATCCGGGGGGGGGGCAGAACCACTCCGCCGT

SEC ID Nº: 42 - cebador oligonucleotídico
 CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

40 **SEC ID Nº: 43 - B_{M1239}C_{MC58}**

QNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNKLYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAAD
 IKPDGKRHAVISGSVLYN

SEC ID N°: 44 - BC₂₉₉₆BC_{M1239}

QDHSVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAE
LKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVS
GLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGD
RAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N°: 45
GKGGGG

5 **SEC ID N°: 46 - Cebador**
CGCGGATCCCATATGCAAAGCCATTCCGCCTTAA

SEC ID N°: 47 - Cebador
CGCGGATCCTTGCTTGGCGGCAAGGC

10 **SEC ID N°: 48 - Cebador**
CGCGGATCCGGGGGGGGGGCAGAACCACTCCGCCGT

SEC ID N°: 49 - Cebador
CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N°: 50 - Cebador
CGCGGATCCGGGGGGGGGGCAGGACCACTCCGCCG

15 **SEC ID N°: 51 - Cebador**
CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N°: 52

QSHSALTAFOEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAA
DIRKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKSYSLSGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGGGQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLV
SGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFG
DRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGQDHSVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGG
KLYTTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N°: 53

20 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKCLKLAAQGAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTAFOEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEEKSYSLSGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGSDRLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
TLEDSPQNGTLTSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQR
SFLV SGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHL
ALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKCLKLAAQGAEKTYGN
GDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKA
FSSDDAGGKLYTTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIA
GKQ

SEC ID N°: 54 - Secuencia para expresión
GKGPDSDRLQRR

SEC ID N°: 55 - Cebador oligonucleotídico
CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

25 **SEC ID N°: 56 - Cebador oligonucleotídico**
CGCGGATCCTTGCTTGGCGGCAAGGC

SEC ID N°: 57 - Cebador oligonucleotídico
CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

30 **SEC ID N°: 58 - Cebador oligonucleotídico**
CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N°: 59 - Cebador oligonucleotídico

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID Nº: 60 - Cebador oligonucleotídico
CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID Nº: 61 - Sustitución de bucle en superficie

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQINNPKIDSMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDQLPDGKATYRGTAFGSDDPNGKLYTIDFAA
KQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKADEKSHAVISGSVLYGSEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIGEKVHEIGLAAKQ

5

SEC ID Nº: 62 - cepa 4243

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVD
LAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTVNGIRHIGLAAKQ

SEC ID Nº: 63 - cepa gb320

CSSGSGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTFKVGDKNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTI
TLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
PEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

10 **SEC ID Nº: 64 - cepa S10026**

CSSGGGGSGGGVAADIGVGLADALTTPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQITL ASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTP
QNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEC ID Nº: 65 - cepa m3813

CSSGGGGSGGIAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTI
LASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP
EQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVIGEKVHEIGIAGKQ

15 **SEC ID Nº: 66 - Cebador SDM**
GATTTCCGCCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAA

SEC ID Nº: 67 - Cebador SDM
TCCCTGCTTGGCGGCGAAATCTATGGTGTAGGT

SEC ID Nº: 68 - Cebador SDM
GCCGCCGATATCAAGCCGGATAAAAAACGCCATGCC

20 **SEC ID Nº: 69 - Cebador SDM**
ATCCGGCTTGATATCGGCGGCGGCCAGGTGCAC

SEC ID Nº: 70 - Cebador SDM
GATATCAAGCCGGATGGAAAACACCATGCCGTCATCAGC

25 **SEC ID Nº: 71 - Cebador SDM**
TTTTCCATCCGGCTTGATATCGGCGGCGGCCAGGTC

SEC ID Nº: 72 - Cebador SDM
GCCTTTCCAGACCGAGCAAATAACAACCCGGACAAAATCGACAGCATGGTTGCGAAACGC

SEC ID Nº: 73 - Cebador SDM
TATTTGCTCGGTCTGAAAGGCGGTTAAGGCGGA

30 **SEC ID Nº: 74 - Cebador SDM**
GGCGAACATACATCTTTTGACCAGCTTCCCGACGGCAAAGGGCGACATATCGC

SEC ID Nº: 75 - Cebador SDM
GTCAAAAGATGTATGTTCCGCCGCTATGTCGCC

SEC ID Nº: 76 - Cebador SDM

ACGGCGTTCGGTTCAGACGATCCGAACGGAAAACCTGACCTAC

SEC ID Nº: 77- Cebador SDM

ATCGTCTGAACCGAACGCCGTCCCGCGATATGTCGC

5 **SEC ID Nº: 78 - Cebador SDM**

GATTTGCGCCGCAAGCAGGGACACGGCAAATCGAA

SEC ID Nº: 79 - Cebador SDM

TCCCTGCTTGCGGCGAAATCTATGGTGTAGGT

10 **SEC ID Nº: 80 - Cebador SDM**

CTGGCCGCGCCGATATCAAGGCCGATGAAAAAGCCATGCCGTCATC

SEC ID Nº: 81 - Cebador SDM

CTTGATATCGGCGGCGGCCAGGTCGACATTGAG

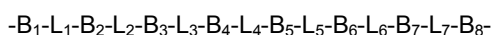
SEC ID Nº: 82 - Cebador SDM

ATCAGCGGTTCCGTCTTTACGGCAGCGAAGAGAAAGGCAGT

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una secuencia de aminoácidos NMB1870 quimérica, que comprende las etapas de: (a) alinear una primera secuencia de aminoácidos NMB1870 con una segunda secuencia de aminoácidos NMB1870, en la que la primera y segunda secuencias son diferentes y provienen de familias diferentes de aminoácidos, comenzando en el aminoácido a_1 de dicha primera secuencia de aminoácidos y acabando en el aminoácido b_1 de dicha primera secuencia de aminoácidos, en la que la parte es una secuencia de superficie en bucle; (c) seleccionar una parte de la segunda secuencia de aminoácidos, comenzando en el aminoácido a_2 de dicha segunda secuencia de aminoácidos y acabando en el aminoácido b_2 de dicha segunda secuencia de aminoácidos, en la que la parte es una secuencia de superficie en bucle y en la que los restos a_1 y a_2 así como b_1 y b_2 están alineados en el par de secuencias alineadas; y (d) reemplazar dicha parte de la primera secuencia de aminoácidos por dicha parte de la segunda secuencia de aminoácidos, proporcionando así la secuencia de aminoácidos NMB1870 quimérica, en la que la secuencias de aminoácidos comprenden una secuencia estructural, en ocho partes y siete bucles de superficie, uno entre cada parte de la secuencia estructural.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera secuencia es una secuencia NMB1870 de la familia 1.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la primera secuencia es la SEC ID N°: 1.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que los bucles de superficie en la SEC ID N°: 1 son: (1) los aminoácidos 134 a 141; (2) los aminoácidos 162 a 168; (3) los aminoácidos 181 a 182; (4) el aminoácido 197; (5) los aminoácidos 219 a 223; (6) los aminoácidos 234 a 236; (7) los aminoácidos 261 a 267.
5. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la segunda secuencia es la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 3.
6. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que las partes seleccionadas tienen una longitud de al menos 3 aminoácidos.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la parte comprende el bucle de superficie (1).
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la parte comprende el bucle de superficie (2).
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la parte comprende el bucle de superficie (3).
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la parte comprende el bucle de superficie (4).
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la parte comprende el bucle de superficie (5).
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la parte comprende el bucle de superficie (6).
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la parte comprende el bucle de superficie (7).
14. Un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos NMB1870 quimérica, que puede obtenerse por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
15. Un polipéptido que comprende secuencia de aminoácidos:



en la que:

- (a) cada uno de dichos B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , B_5 , B_6 , B_7 y B_8 es: (i) un fragmento de la SEC ID N°: 1; y/o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con dicho fragmento de (i) y/o que comprende un fragmento de al menos 6 aminoácidos contiguos de dicho fragmento de (i);
- (b) cada uno de dichos L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 , L_6 y L_7 es: (iii) un fragmento de la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3, a condición de que al menos uno de dichos L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 , L_6 y L_7 no sea un fragmento de la SEC ID N°: 1,

y en la que de B_1 a B_8 se definen de la siguiente manera:

Coordenadas de aminoácidos dentro de la SEC ID N°: 1							
B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈
1-133	142-161	169-180	183-196	198-218	224-233	237-260	268-274

y en la que de L₁ a L₇ se definen de la siguiente manera:

Coordenadas de aminoácidos dentro de la SEC ID N°: 1, 2 o 3							
SEC	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇
1	134-141	162-168	181-182	197	219-223	234-236	261-267
2	134-141	162-167	180-181	196	218-222	233-235	260-266
3	142-149	170-175	188-189	204	226-230	241-243	268-274

- 5 16. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia global con la SEC ID N°: 1 de al menos 80%, en la que: la identidad de dicha secuencia de aminoácidos con la SEC ID N°: 1 es superior al 80% en las regiones estructurales de la SEC ID N°: 1; y la identidad de secuencia de dicha secuencia de aminoácidos con la SEC ID N°: 1 es inferior al 80% en las regiones en bucle de la SEC ID N°: 1, en la que la secuencia de aminoácidos comprende una estructura, en ocho regiones estructurales, y siete regiones en bucle, una entre cada parte de la secuencia estructural.
- 10 17. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia global con la SEC ID N°: 2 de al menos 80%, en la que: la identidad de secuencia de dicha secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 es superior al 80% en las regiones estructurales de la SEC ID N°: 2; y la identidad de secuencia de dicha secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 2 es inferior al 80% en las regiones en bucle de la SEC ID N°: 2, en la que la secuencia de aminoácidos comprende una estructura, en ocho regiones estructurales, y siete regiones en bucle, una entre cada parte de la secuencia estructural.
- 15 18. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia global con la SEC ID N°: 3 de al menos 80%, en la que: la identidad de secuencia de dicha secuencia de aminoácidos con la SEC ID N°: 3 es superior al 80% en las regiones estructurales de la SEC ID N°: 3; y la identidad de secuencia de dicha secuencia de aminoácidos con la SEC ID N°: 3 es inferior al 80% en las regiones en bucle de la SEC ID N°: 3, en la que la secuencia de aminoácidos comprende una estructura, en ocho regiones estructurales, y siete regiones en bucle, una entre cada parte de la secuencia estructural.
- 20 19. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18.
20. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18.
21. La composición de la reivindicación 20, que comprende adicionalmente un adyuvante de sal de aluminio.
- 25 22. La composición de la reivindicación 20 o reivindicación 21, que adicionalmente comprende una proteína PorA meningocócica.
23. La composición de la reivindicación 20 o la reivindicación 21, que adicionalmente comprende una preparación de vesícula de la membrana externa de *N. meningitidis*.
24. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, para su uso como medicamento.

FIG. 1

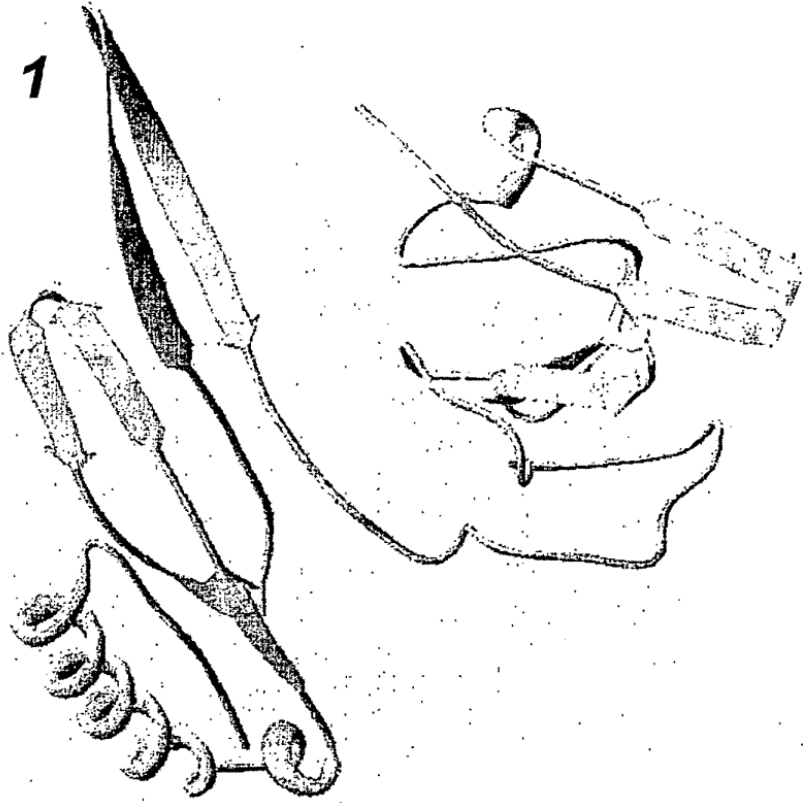


FIG. 2

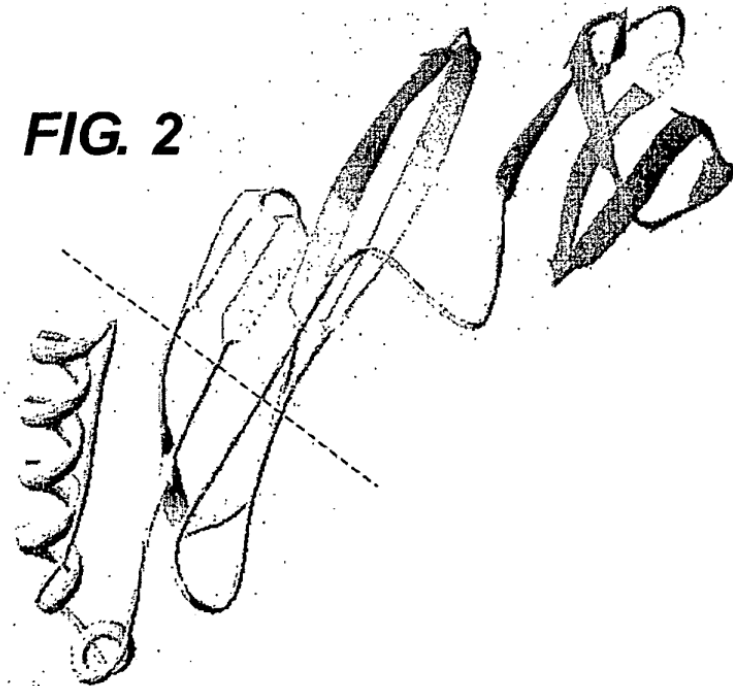


FIG. 3

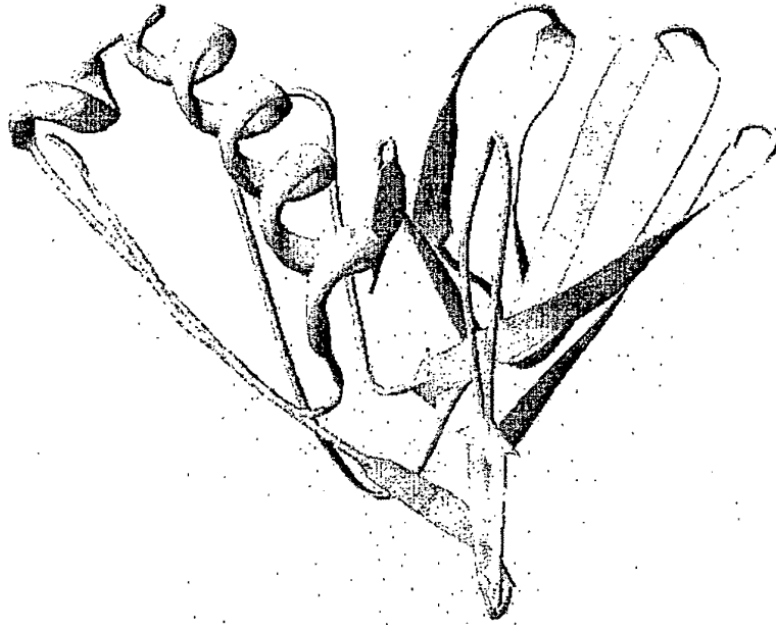


FIG. 4

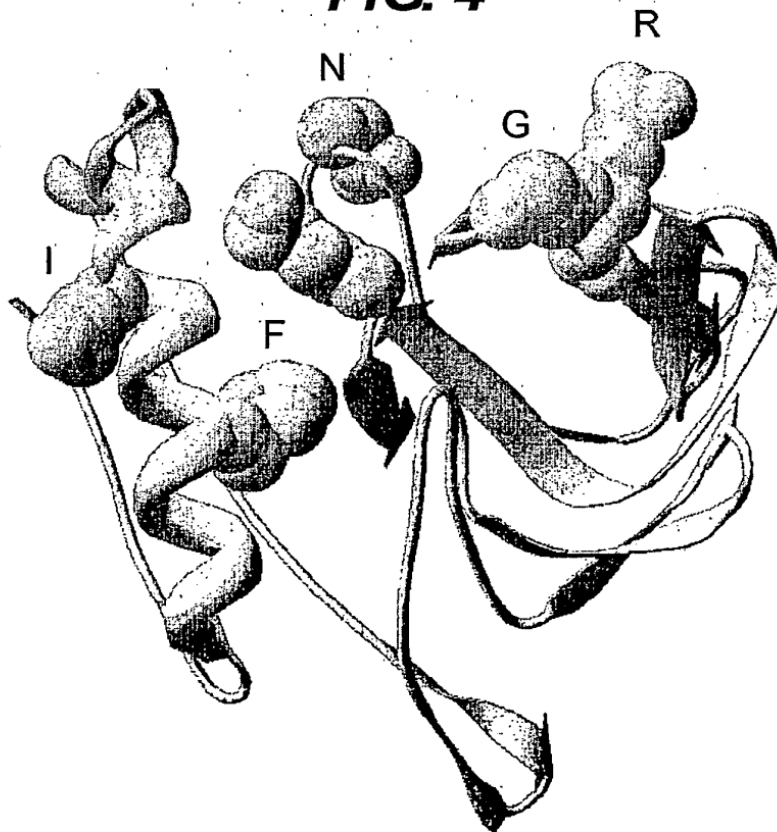


FIG. 5

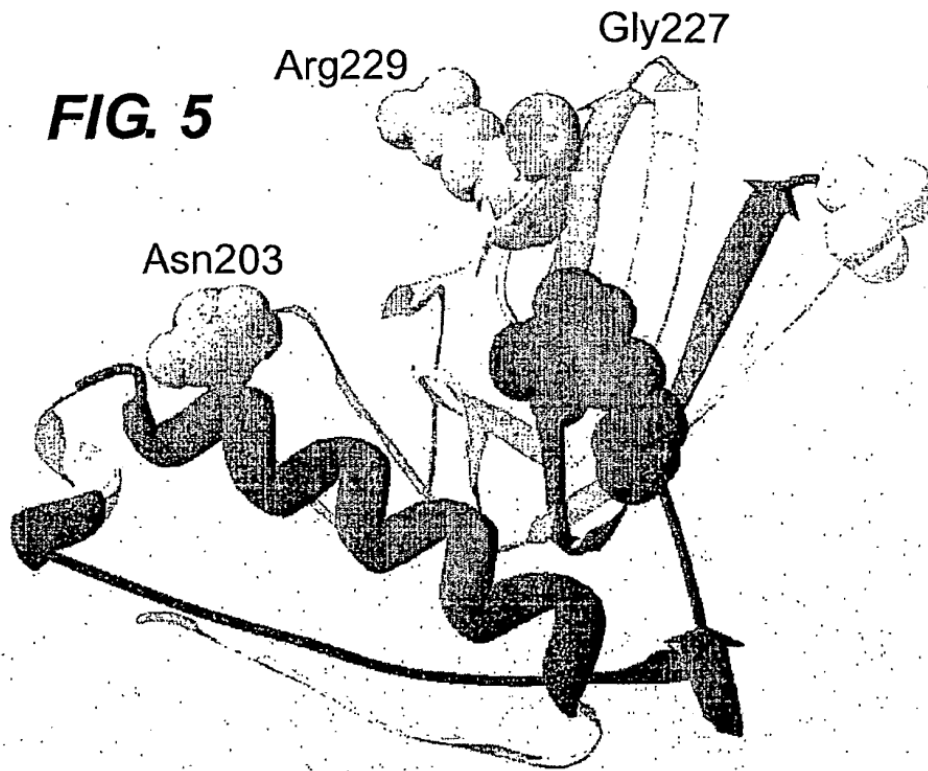


FIG. 6

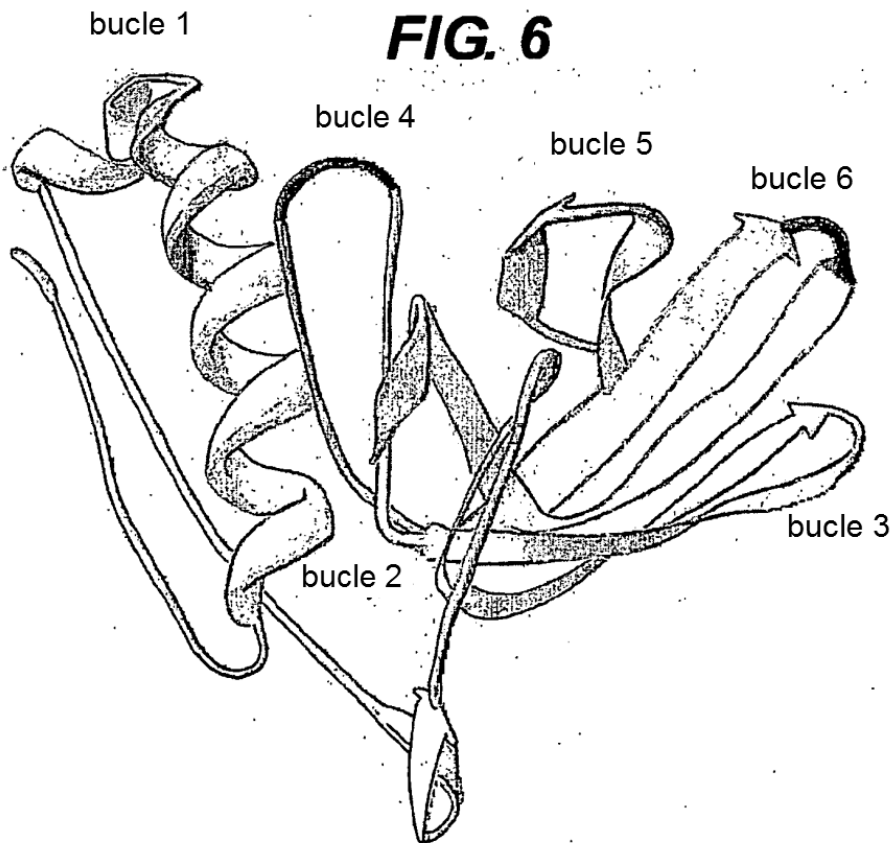


FIG. 7

MTRSKPVNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLD
MTRSKPVNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLD

HKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR
HKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR

FD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFOEQI bucle 1 **NNPKIDSMVA**
FD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFOEQI **QDSEHSGKMVA**

bucle 2 bucle 3
KRQFRIGDIAGEHTSFD **QLPDGK**-ATYRGTAFGSDD **PNGK**LYTIDFAAK
KRQFRIGDIAGEHTSFD **KLPEGGR**ATYRGTAFGSDD **AG**GKLYTIDFAAK

bucle 4 bucle 5 bucle 6
QGHGKIEHLKSPENVDLAAADIK **ADEK**SHAVISGSVLY **GSEEK**GSYSLG
QGN **G**KIEHLKSPENVDLAAADIK **PDGKR**HAVISGSVLY **QAEK**GSYSLG

bucle 7
IFGGKAQEVAGSAEVK **IGEKVHE**IGLAAKQ
IFGGKAQEVAGSAEVK **TVNGIRH**IGLAAKQ

FIG. 8

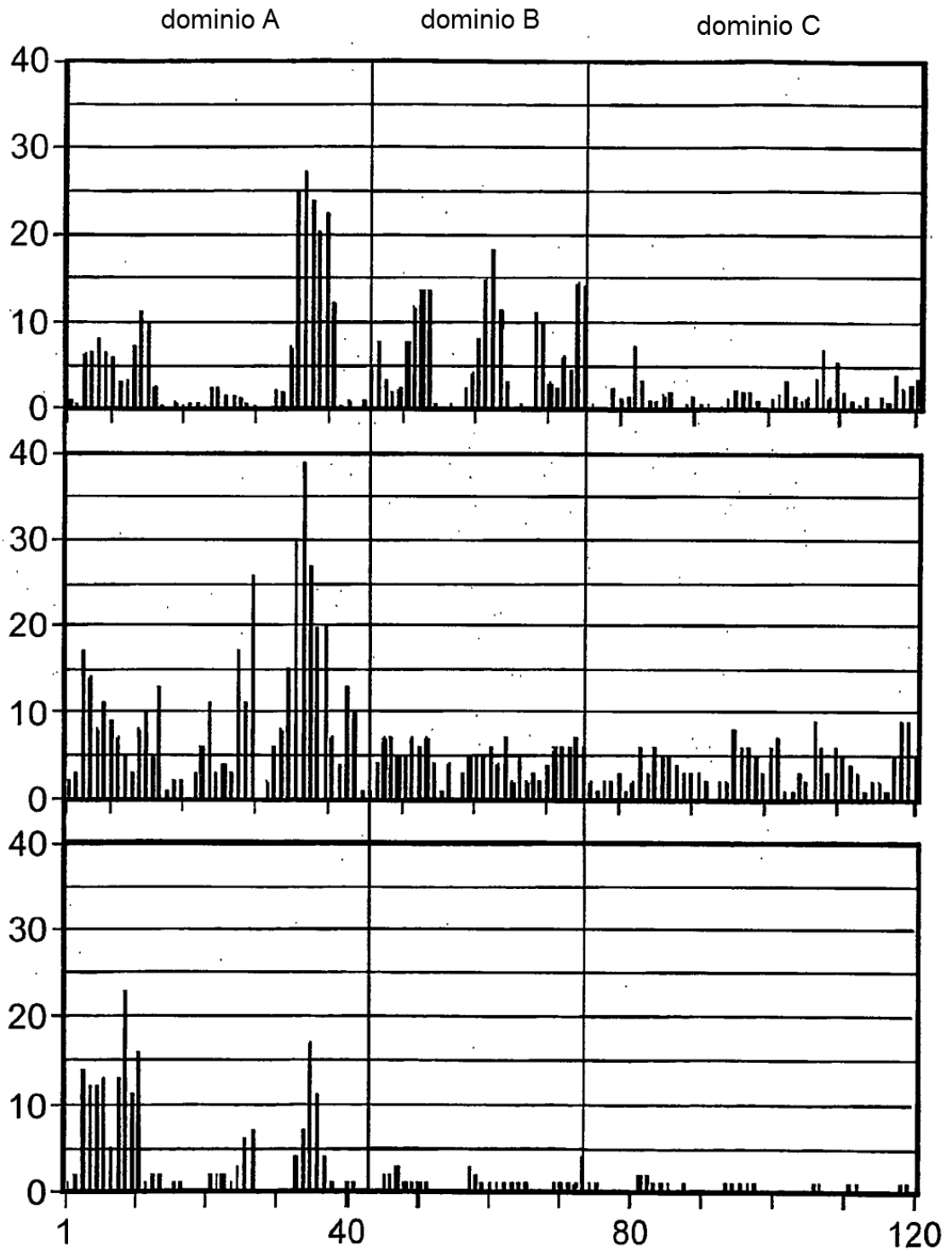


FIG. 9

dominios

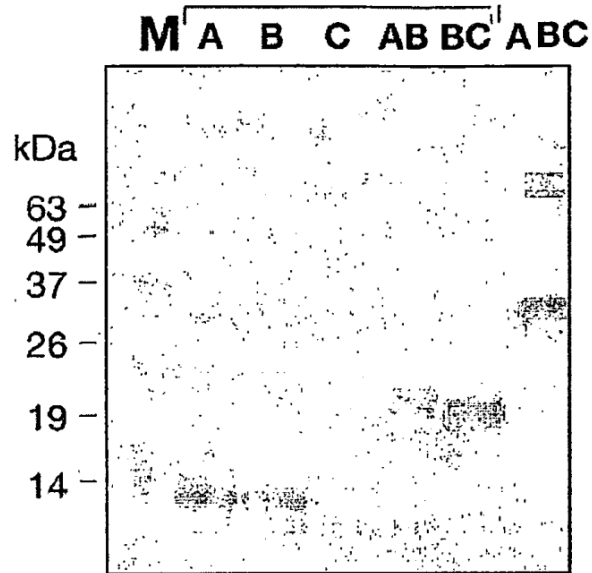


FIG. 11

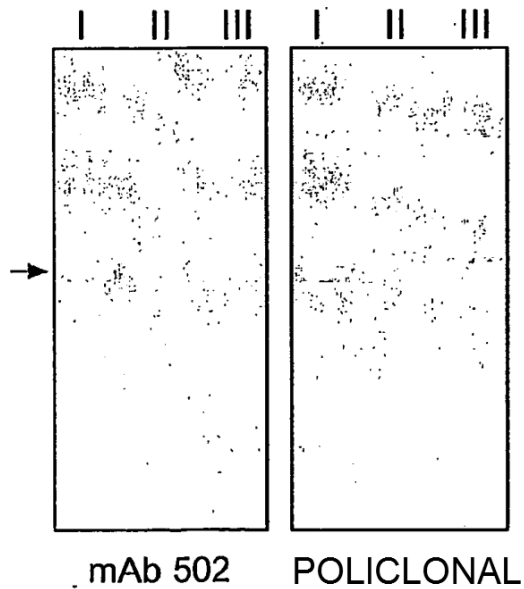


FIG. 10

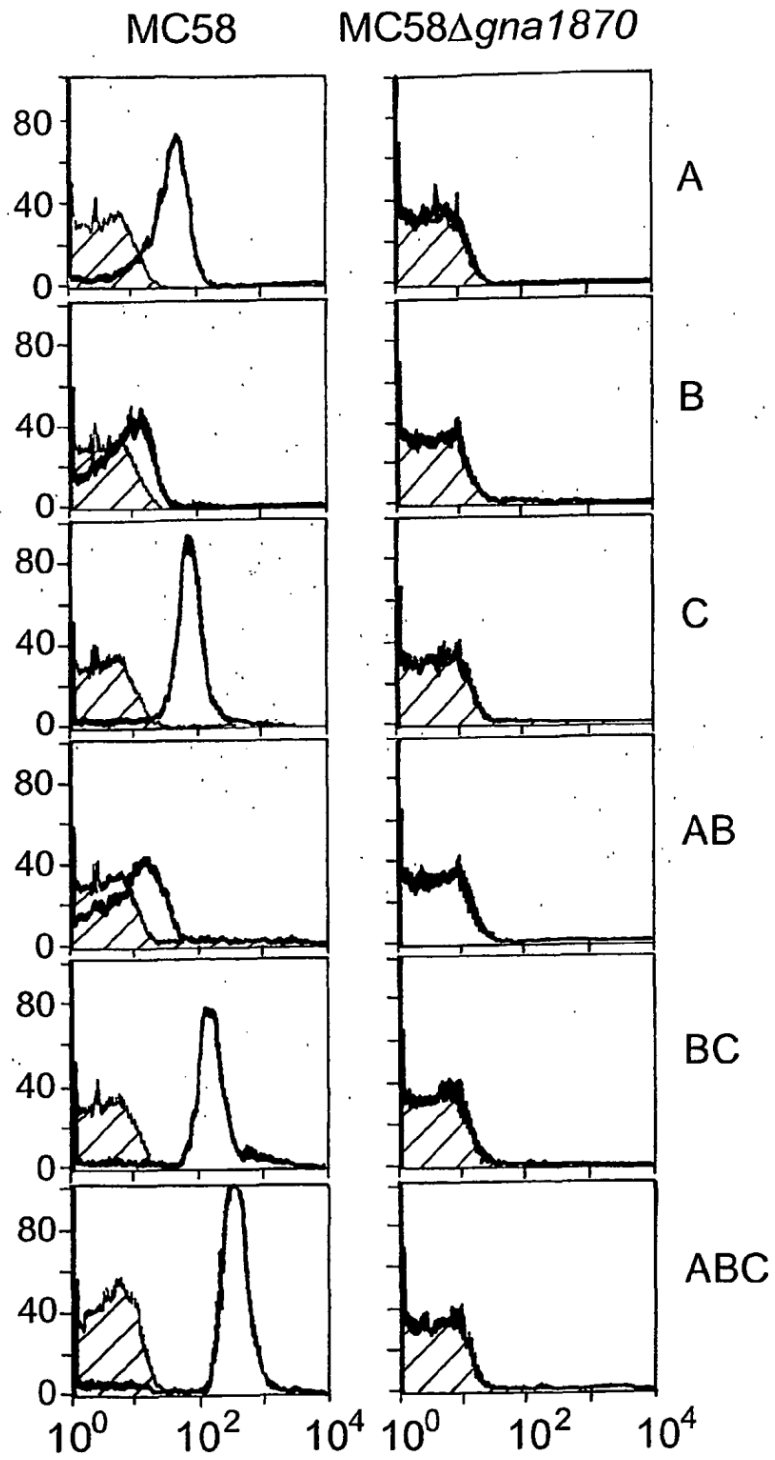


FIG. 12

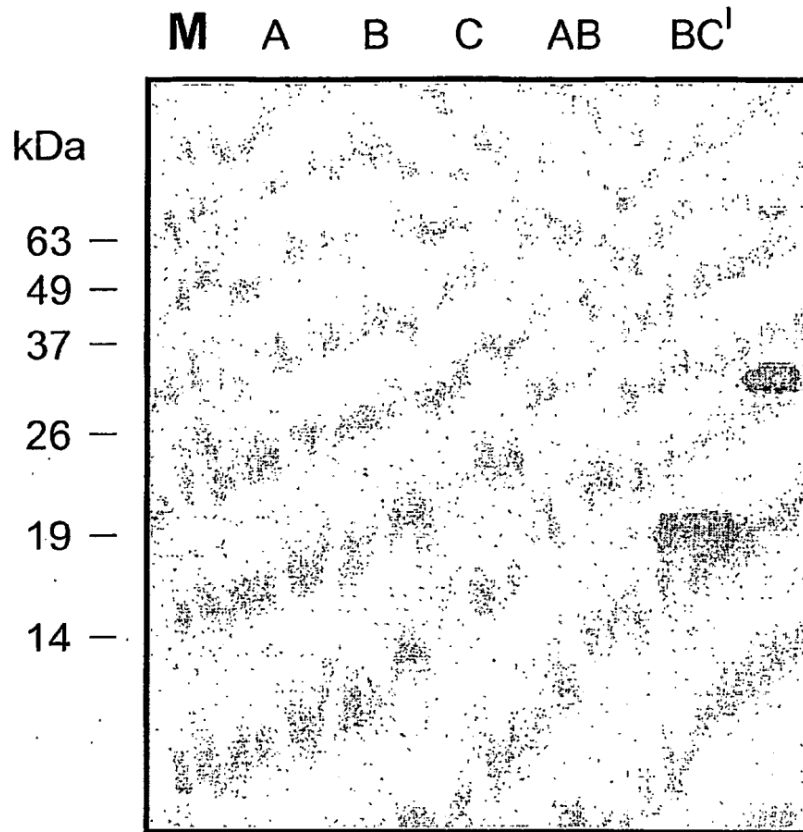


FIG. 13

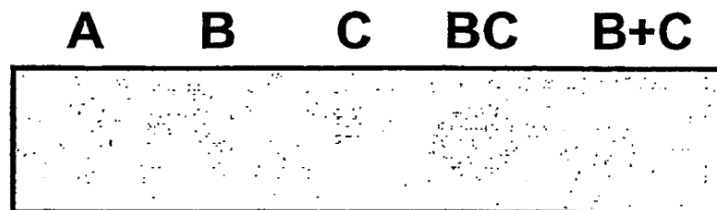


FIG. 14

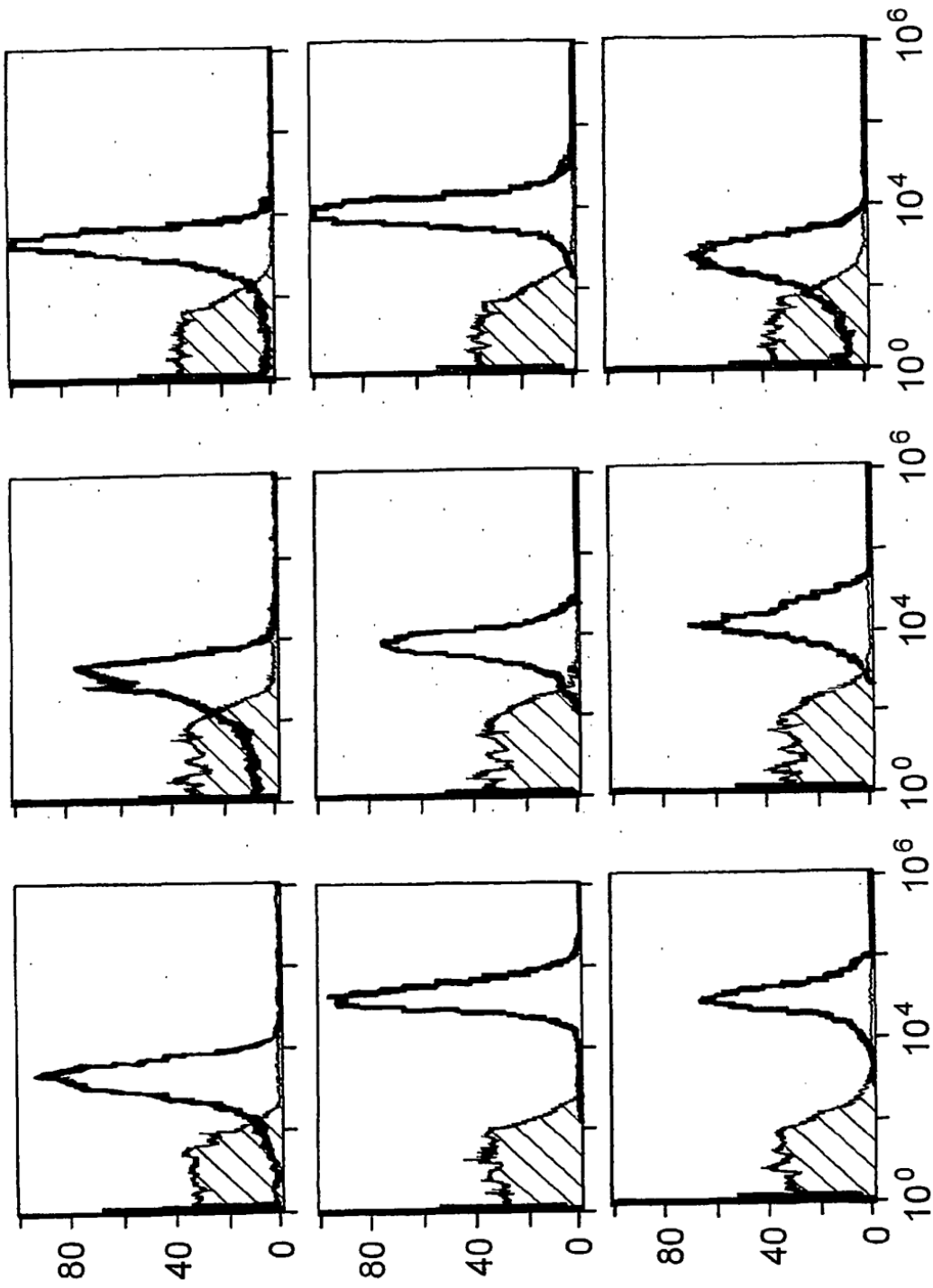
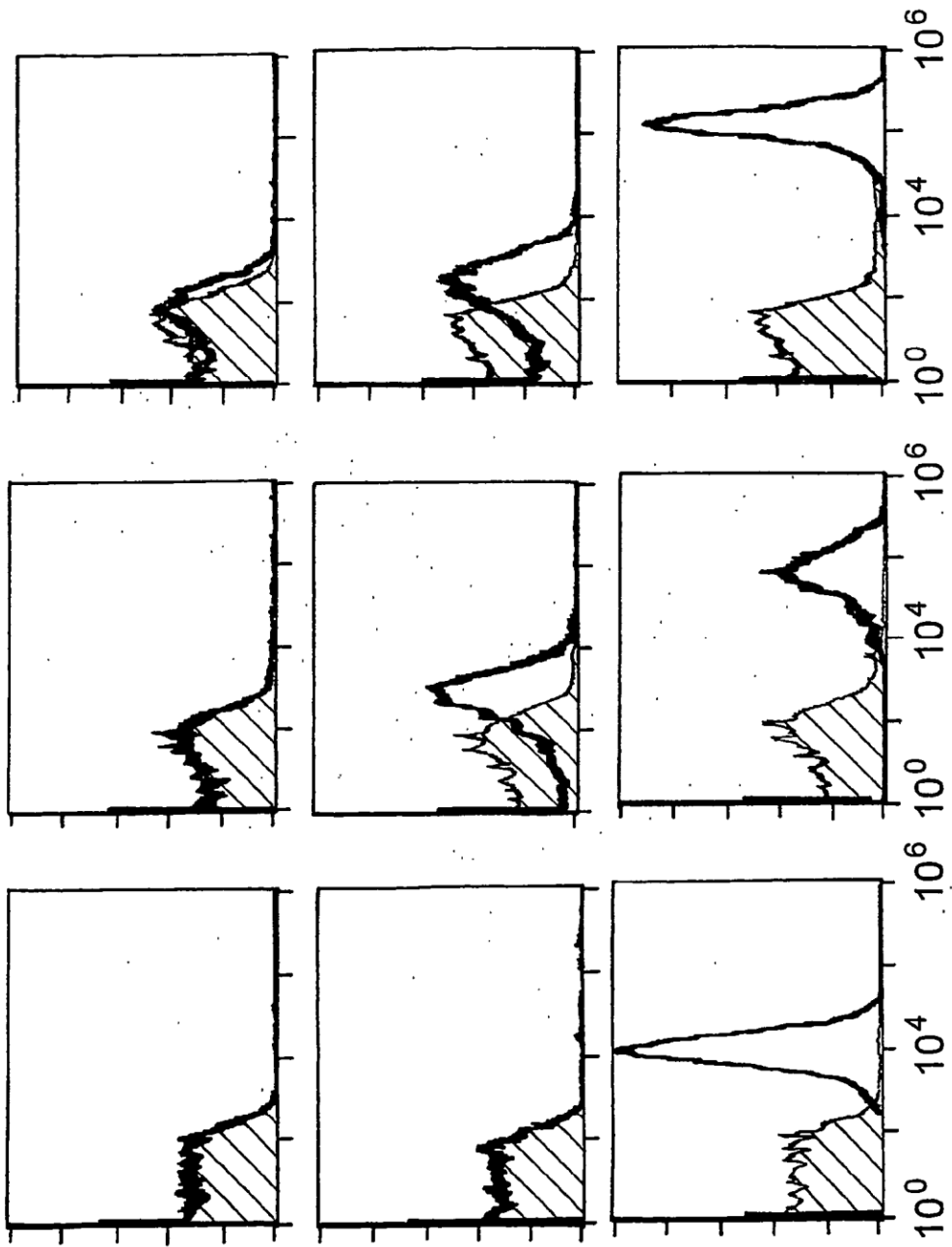


FIG. 15



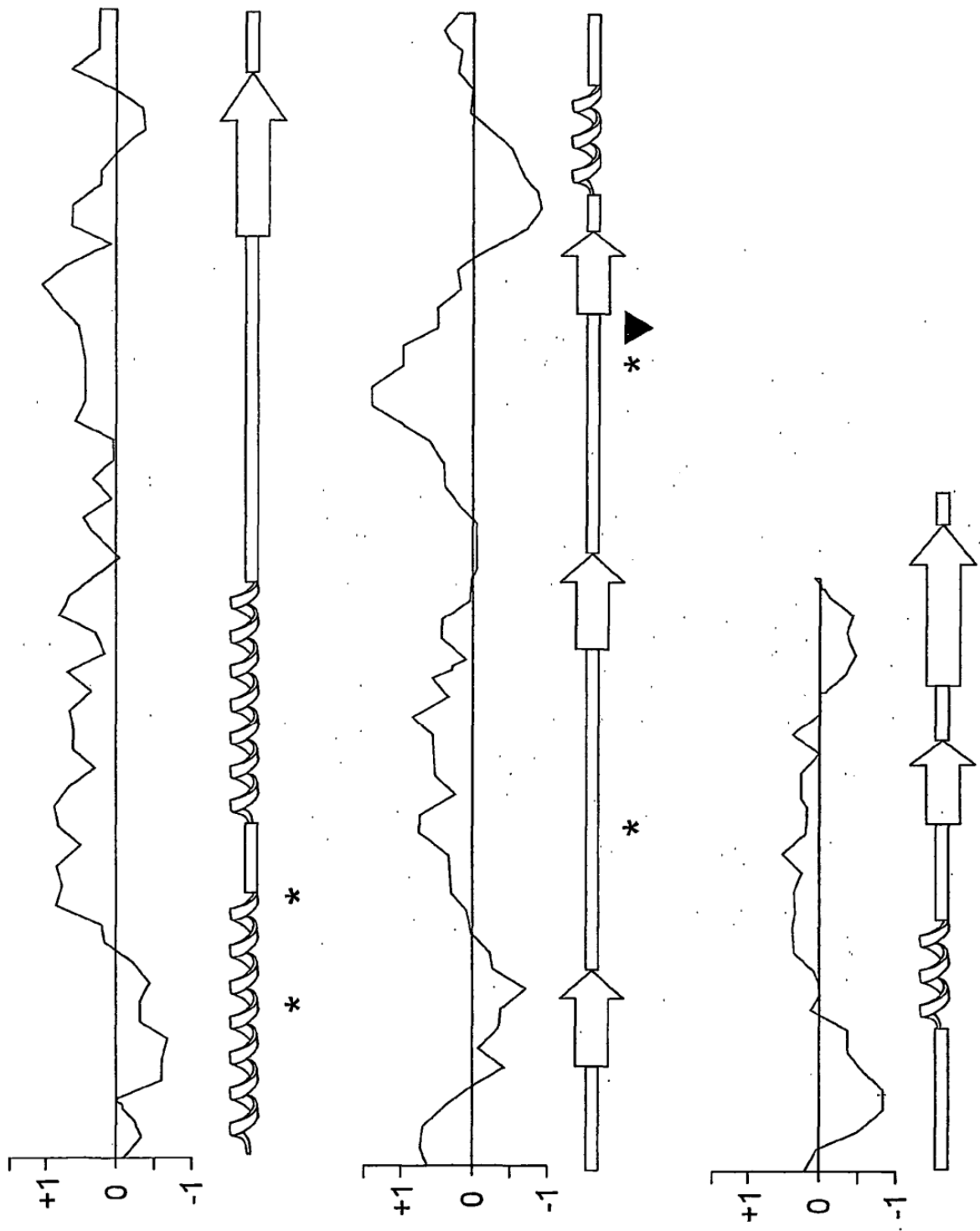


FIG. 16