

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 747**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2003** **E 03780528 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013** **EP 1562983**

54 Título: **Variantes múltiples de protenia NMB 1870 de meningococo**

30 Prioridad:

22.11.2002 GB 0227346

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.01.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COMANDUCCI, MAURIZIO y
PIZZA, MARIAGRAZIA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 436 747 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).

Variantes multiples de protenia NMB 1870 de meningococo**Descripción****5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuentra en el campo de la vacunación y, en particular, en la vacunación contra enfermedades causada por bacterias patógenas del género *Neisseria* tales que *N.meningitidis* (meningococos).

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Neisseria meningitidis es una bacteria encapsulada gram negativa que coloniza el tracto respiratorio superior de, aproximadamente, el 10 % de la población. Aproximadamente, en una de cada 10.000 personas colonizadas (o una de 100.000) la bacteria se introduce en el torrente sanguíneo, donde se multiplica y causa sepsis. Desde el torrente sanguíneo, la bacteria puede atravesarla barrera hematocefálica y causar meningitis. Ambas enfermedades son devastadoras y pueden matar del 5 % al 15 % de los niños y jóvenes adultos en horas, a pesar de que existen antibióticos efectivos. Más del 25 % de los que sobreviven a la enfermedad sufren secuelas permanentes.

La prevención de la enfermedad se ha conseguido parcialmente gracias a la vacunación. La inmunización se hizo posible en 1969 cuando se descubrió que la protección de la enfermedad está relacionada con la presencia de anticuerpos del suero capaces de inducir la destrucción bacteriana mediada por complemento y que los polisacáridos capsulares conjugados eran capaces de inducir estos anticuerpos. Aunque existen vacunas de polisacáridos y las vacunas conjugadas contra los serotipos A, C, W135 e Y, este enfoque no puede aplicarse al serotipo B ya que el polisacárido capsular es un polímero de ácido polisialílico, un autoantígeno en humanos. Para desarrollar una vacuna contra el serotipo B se han utilizado las proteínas expuestas en la superficie de vesículas de la membrana externa. Estas vacunas provocaron respuestas de anticuerpos bactericidas en el suero y protegían de la enfermedad, pero no inducían protección cruzada de cepas [1].

La secuencia genómica completa del serotipo B *N. meningitidis* ya se ha publicado [2] y ha sido sujeto de análisis para identificar antígenos de la vacuna [3]. También se conoce la secuencia genómica completa del serotipo A *N. meningitidis* [4], y la secuencia genómica completa de la cepa FA1090 de *Neisseria gonorrhoeae* se encuentra disponible [5]. Las referencias de la 6 a la 9 describen proteínas de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*, y se describen enfoques de la expresión a estas proteínas en las referencias 10 a 12.

Es objeto de la presente invención proporcionar y mejorar composiciones que otorguen inmunidad contra enfermedades y / o infecciones por meningococos, en particular para el serotipo B.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Una de las, aproximadamente, 2.200 proteínas descritas en la referencia 2 es "NMB1870". En un principio, la proteína se describió como proteína "741" de la cepa MC58 (SECs ID N° 2535 y 2536 de la referencia 8M SEC ID N° 1) y también se ha nombrado como "GNA1870" [referencia 3] o como "ORF2086" [13].

La referencia 13 describe diversas secuencias de NMB1870 y las divide en subfamilias "A" y "B". Estas subfamilias pueden combinarse. La referencia 13 no describe combinaciones adyuvantes con una sal de aluminio y no describe la unión de las subfamilias A y B como una proteína de fusión.

Se ha descubierto que NMB1870 es un antígeno extremadamente efectivo para provocar respuestas de anticuerpos frente al meningococo y que es expresado por todos los serotipos meningococo. Se ha encontrado NMB1870 en todas las cepas meningocócicas probadas hasta la fecha. Se han identificado cuarenta y dos secuencias meningocócicas diferentes de NMB1870, y se ha descubierto que esas secuencias se agrupan en tres variantes. Además, se ha descubierto que el suero producido contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo de variante, pero no es activo contra cepas que expresen una de las otras dos variantes, es decir, hay protección cruzada dentro de las variantes pero no entre variantes. Por lo tanto, para una mayor eficacia cruzada de las cepas, debería utilizarse más de una variante para inmunizar un paciente.

La invención presenta además una composición que comprende, al menos, los siguientes dos antígenos:

- (a) Una primera proteína compuesta de una secuencia aminoácida que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el *a* % respecto a la SEC ID N° 24; y
- (b) Una segunda proteína compuesta de una secuencia aminoácida que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el *b* % respecto a la SEC ID N° 33 y también incluyen una sal de aluminio adyuvante.

El valor de *a* es, al menos, 85, por ejemplo 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de *b* es, al menos, 85, por ejemplo 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. Los valores de *a* y *b* no están intrínsecamente relacionados unos con otros.

Las proteínas (a) y (b) están estrechamente relacionadas a sus secuencias "prototipo", pero no están tan estrechamente relacionadas la una con la otra.

5 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a, al menos, una cepa de *N. meningitidis* de cada grupo, al menos dos, de los siguientes tres grupos de cepas:

10 (a) MC58, gb185 (= M01 – 240185), m4030, m2197, m2937, iss1001, NZ394 / 98, 67/00, 93 / 114, b198, 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.

(b) 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.

15 (c) M1239, 16889, gb355 (= M01 – 240355), m3369, m3813, ngp165.

Por ejemplo, la mezcla puede obtener una respuesta bactericida efectiva frente a cada serotipo B de las cepas MC58, 961 – 5945 y M1239 de *N. meningitidis*.

20 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a, al menos, el 50 % de las cepas meningocócicas clínicamente relevantes del serotipo B (por ejemplo, al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más).

25 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas del serotipo B y cepas de, al menos, uno (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) de los serotipos A, C, W135 e Y.

La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas de *N. gonococcus* y / o *N. cinerea*.

30 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas de, al menos, dos de las tres ramas principales del dendrograma mostrado en la Figura 9 (es decir, el dendrograma obtenido por el análisis de las SECs ID 1 a 23 mediante el algoritmo de Kimura & Jukes – Cantor).

35 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas *N. meningitidis* en, al menos, 2 (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o 7) de las razas hipervirulentas ET – 37, ET – 5, el cúmulo A4, la raza 3 y los subgrupos I, III y IV – 1 [14, 15].

Las composiciones de la presente invención puede inducir adicionalmente respuestas anticuerpo bactericidas frente a una o más razas hiperinvasivas.

40 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas de *N. meningitidis* en, al menos, 2 (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o 7= de los siguientes tipos de secuencia multilocus: ST1, ST4, ST5, ST8, ST11, ST32 y ST41 [16]. La mezcla puede también obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a las cepas ST44.

45 Las respuestas anticuerpo bactericidas se han medido convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [véase, por ejemplo, la nota final de la referencia 3]. La composición no necesita inducir anticuerpos bactericidas frente a todas y cada una de las cepas MenB en las razas especificadas o MLST; más bien, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas del serotipo B meningococos en una raza hipervirulenta en particular o un MLST, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas frente a, al menos, el 50 % (por ejemplo el 60 %, 70%, 80 %, 90 % o más) del grupo. En la forma preferente, los grupos de cepas incluirán cepas aisladas en, al menos, cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. Preferiblemente, 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 superior, preferiblemente de, al menos, 2^{14}), es decir, el suero es capaz de matar al menos al 50 % de la bacteria de prueba de una cepa en particular cuando se diluye 1 / 1024, por ejemplo, como se describe en la nota final 14 de la referencia 3.

Lipoproteínas

60 NMB1870 es una lipoproteína natural de *N. meningitidis*. También se ha descubierto lipídada cuando se expresa en *E. coli*.

En la forma preferente, la o las (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) proteínas NMB1870 incluidas en las composiciones de la invención son lipoproteínas.

65 En la forma preferente, la lipoproteína tiene un residuo de cisteína N – Terminal al que se une el lípido

covalentemente. Preparar la lipoproteína mediante expresión bacteriana requiere, por lo general, una señal peptídica N – Terminal apta para dirigir la lipidación mediante transferasa diacilgliceril, seguida del corte por una peptidasa señal específica de lipoproteínas (peptidasa señal II). Aunque la lipoproteína de la invención puede tener una cisteína N – Terminal (por ejemplo, las SECs ID 24 a 45), también será un producto de modificación post-translacional de una proteína naciente que tenga la metionina N – Terminal corriente (por ejemplo, las SECs ID 1 a 22).

La lipoproteína puede asociarse con una bicapa lipídica y solubilizarse con detergente.

10 **Secuencias**

Las proteínas NMB1870 útiles para la presente invención comprenden una secuencia aminoácida con identidad de secuencia de una o más de las SECs ID 1 a 23 y / o con fragmentos de una o más de las SECs ID 1 a 23.

15 Las proteínas NMB1870 útiles para la presente invención comprenden una secuencia aminoácida con identidad de secuencia de una o más de las SECs ID 1 a 252 de la referencia 13 y / o con un fragmento de una o más de las SECs ID 1 a 252 de la referencia 13. Las SECs ID 300 – 302 de la referencia 13 presentan secuencias consenso y las SECs ID 254 – 299 son fragmentos.

20 En la forma preferente, las secuencias aminoácidas con menos del 100 % de identidad respecto a las SECs ID Nº 1 a 23 son variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas, mutantes, etc de las mismas. En la forma preferente, la o las diferencias en las variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas o mutantes, en comparación a las SECs ID Nº 1 a 23, suponen la sustitución de un aminoácido conservativo, es decir, la sustitución de un aminoácido con otro que tiene una cadena lateral relacionada. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen, generalmente, en cuatro familias: (1) ácido, es decir, aspartato, glutamato; (2) básico, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polar, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar sin carga, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican, a veces, como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos simples de estas familias no tiene un efecto mayor en la actividad biológica.

30 En la forma preferente, el subconjunto de proteínas no incluye las secuencias aminoácidas TRSKP (SEC ID Nº 70) ni TRSKPV (SEC ID Nº 71) en 10 aminoácidos del extremo N – Terminal de la proteína. En la forma preferente, otro subconjunto de proteínas no incluye la secuencia aminoácida PSEPPFG (SEC ID Nº 72) en 10 aminoácidos del extremo N – Terminal de la proteína.

35 En la forma preferente, otro subconjunto de proteínas para su utilización con la presente invención incluye la secuencia aminoácida (GLY)_n, donde n es 1, 2, 3, 4 o más, por ejemplo, SEC ID Nº 73.

40 Una característica de las proteínas preferidas de la invención es la habilidad para inducir anticuerpos bactericidas frente al meningococo tras su administración a un animal huésped.

45 Las proteínas se pueden preparar mediante diversos medios como, por ejemplo, la síntesis química (al menos en parte), la digestión de polipéptidos largos mediante proteasas, la traducción a partir de ARN, la purificación a partir de cultivos celulares (por ejemplo a partir de expresión recombinante o de cultivos de *N. meningitidis*), etc. La expresión heteróloga en un huésped de *E. coli* es la ruta de expresión preferida (por ejemplo, las cepas DH5α, BL21 (DE₃), BLR, etc.).

Las proteínas de la invención pueden estar unidas a o inmobilizadas en un soporte sólido.

Las proteínas de la invención pueden comprender una marca detectable como, por ejemplo, una marca radioactiva, fluorescente o de biotina. Esto resulta particularmente práctico en las técnicas de inmunoensayo.

50 Las proteínas pueden tomar diversas formas (por ejemplo nativas, de fusión, glicosiladas, no glicosiladas, lipídicas, puentes disulfuro, etc). En la forma preferente las proteínas son proteínas meningocócicas.

55 En la forma preferente, las proteínas se preparan de forma sustancialmente pura o sustancialmente aislada (es decir, sustancialmente libre de otros Neisseria o proteínas celulares del huésped) o de forma sustancialmente aislada. En general, las proteínas se proporcionan en un medio no natural, por ejemplo, se separan de sus medio natural. En ciertas realizaciones, la proteína sujeto está presente en una composición enriquecida para la proteína en comparación al control. Por definición, la proteína purificada se presenta a través de la cual purificado significa que la proteína se presenta en una composición sustancialmente libre de otras proteínas expresadas, en la que sustancialmente significa que menos del 90 %, normalmente menos del 60 % y más normalmente menos del 50 % de la composición está realizada de otras proteínas expresadas.

60 El término “proteína” aquí utilizado se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, pueden comprender aminoácidos modificados y pueden estar interrumpidos por ácidos o aminados. El término también abarca un polímero aminoácido que ha sido modificado de manera natural o por intervención como, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o

cualquier otra manipulación o modificación tales que la conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en las definiciones las proteínas que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos artificiales, etc), así como otras modificaciones conocidas en la disciplina. Las proteínas pueden darse como cadenas únicas o cadenas asociadas.

5 La invención puede utilizar proteínas con una o más de las SECs ID N° 77, 79, 82, 83, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 y 94.

Proteínas híbridas y en tándem

10 Como se ha mencionado anteriormente, NMB1870 puede utilizarse en forma de proteína de fusión, aunque las proteínas también pueden ser expresadas de otra manera que como proteínas de fusión (por ejemplo, sin GST, MBP, con marca de polihistidina o similar).

15 Las proteínas de fusión pueden tener una pareja de fusión C – Terminal o N – Terminal. Cuando se utiliza una pareja de fusión N – Terminal con las SECs ID 1 a 23, el experto podrá ver que el codón inicial se expresará (si se incluye) como una valina, ya que GTG se traduce como valina excepto cuando se utiliza como codón inicial, en cuyo caso se traduce como N – formilmetionina.

20 Las parejas de fusión aptas incluyen péptidos guía de otras proteínas (en particular, de otras lipoproteínas), que pueden sustituirse por los péptidos guía naturales NMB1870 (es decir, la secuencia anterior a la cisteína N – Terminal puede reemplazarse con otro péptido guía de interés). Se pueden citar como ejemplos las secuencias que comprenden SEC ID N° 46 y la secuencia guía de lipoproteínas P4 de *H. influenzae* [ejemplo 17].

25 El tipo de proteína de fusión preferida se describe en las referencias 10, 11 y 12, en las que dos o más (por ejemplo 3, 4, 5, 6 o más) proteínas Neisseria están unidas de tal manera que se traducen como una cadena polipeptídica única. En general, dichas proteínas híbridas pueden representarse por la fórmula:



30 en la que X es una secuencia aminoácida compuesta de una secuencia Neisseria, L es una secuencia aminoácida de unión opcional, A es una secuencia aminoácida N – Terminal opcional, B es una secuencia aminoácida C – Terminal opcional y n es un número entero superior a 1. El valor de n está entre 2 y x , y el valor de x es típicamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Preferiblemente, n es 2, 3, o 4, más preferiblemente, 2 o 3 y más preferiblemente, $n = 2$.

35 Según la presente invención, al menos una de las partes – X – es una secuencia NMB1870 como se ha definido anteriormente. En algunas proteínas híbridas, denominadas como proteínas “en tándem”, al menos una de las partes – X – tiene una identidad de secuencia respecto a, al menos, una de las otras partes X, por ejemplo X_1 es la SEC ID N° 24 y X_2 es la SEC ID N° 25. Se prefieren las proteínas en las que dos o tres de las tres variantes de NMB1870 se unen como una proteína en tándem.

40 Para las partes X diferentes de X_1 , es preferible omitir el péptido guía nativo, particularmente cuando X_1 no es una secuencia NMB1870. En una realización, los péptidos guía se eliminan excepto para la parte – X – localizada en el extremo N – Terminal de la proteína híbrida, es decir, el péptido guía de X_1 se conservará, pero los péptidos guía de $X_2 \dots X_n$ se omitirán. Esto equivale a eliminar todos los péptidos guía y utilizar el péptido guía de X_1 como parte – A –

45 En la forma preferente, las secuencias NMB1870 para su utilización como partes – X – se truncan e incluyen la secuencia de poli – glicina encontrada cerca del extremo N – Terminal maduro, por ejemplo, la secuencia NMB1870 empezará VAA ... (o IAA... para la cepa m3813). Dichas secuencias NMB1870 incluyen las SECs ID N° 80,81 y 84.

50 Para cada caso de n de $[- \text{X} - \text{L} -]$, la secuencia aminoácida de unión – L – puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n = 2$, el híbrido puede ser $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{L}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$, $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{COOH}$, $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{L}_1 - \text{X}_2 - \text{COOH}$, $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$, etc. La o las secuencias aminoácidas de unión – L – serán cortas (por ejemplo, 20 aminoácidos o menos, es decir, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos incluyen secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, la unión de poli – glicina (es decir, Gly_n cuando $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), y marcas de histidina (es decir, His_n cuando $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias aminoácidas de unión adecuadas resultarán evidentes para los expertos en la disciplina. Un enlace útil es GSGGGG (SEC ID N° 144), estando el dipéptido Gly – Ser formado a partir de un sitio de restricción BamHI, interviniendo así en la clonación y la manipulación; y el tetrapéptido Gly_4 (SEC ID N° 73) es otro enlace de poli – glicina típico. Otro enlace útil es la SEC ID N° 78.

60 – A – es una secuencia aminoácida N – Terminal opcional. Esta secuencia será normalmente corta (por ejemplo, 40 aminoácidos o menos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos incluyen secuencias guías para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo, las marcas de histidina, es decir, His_n cuando $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias aminoácidas N –

Terminal adecuadas resultarán evidentes para los expertos en la disciplina. Si X_1 carece de su propia metionina N – Terminal, – A – puede proporcionar un residuo de metionina en la proteína traducida (por ejemplo, – A – es un residuo Met único). Una parte – A – útil para expresa NMB1870 es la SEC ID N° 86. En lipoproteínas maduras, – A – proporciona preferiblemente una cisteína N – Terminal (por ejemplo, – A – es un residuo Cys único).

5 – B – es una secuencia aminoácida C – Terminal opcional. Esta secuencia será normalmente corta (por ejemplo, 40 aminoácidos o menos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos incluyen secuencias guías para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo, las marcas de histidina, es decir, His_n cuando $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), o secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas. Otras secuencias aminoácidas C – Terminal adecuadas resultarán evidentes para los expertos en la disciplina.

15 En la forma preferente, en las proteínas híbridas de la invención, una de las partes – X – es una secuencia de la “proteína 936”. Por ejemplo, cuando $n = 2$, A = Met, X_1 es una secuencia 936 (por ejemplo, la SEC ID N° 76, que es la proteína MC58 procesada), L_1 = un enlace de poli – glicina (por ejemplo, SEC ID N° 144), X_2 = una secuencia NMB1870 en la que el extremo N – Terminal ha sido eliminado e incluye su propia secuencia de poli – glicina y L_2 y B pueden omitirse. Un ejemplo de esta proteína híbrida es la SEC ID N° 77, en la que el NMB1870 truncado de la cepa m1239 ha descendido de la proteína procesada 936 de la cepa MC58. Otros ejemplos de proteínas híbridas de 20 936 (cepa 2996) y el NMB1870 truncado (cepa 2996 o M1239) son las SECs ID N° 91, 92, 93 y 94.

Las proteínas en tándem preferibles cuando $n = 3$ pueden tener las tres variantes de NMB1870 en cualquier orden:

X_1	1	1	2	2	3	3
X_2	2	3	1	3	1	2
X_3	3	2	3	1	2	1

25 Las proteínas en tándem preferibles cuando $n = 2$ pueden tener dos variantes diferentes de NMB1870:

X_1	1	1	2	2	3	3
X_2	2	3	1	3	1	2

30 Algunos ejemplos de proteínas en tándem cuando $n = 2$ (dos variantes diferentes de NMB1870) son las SECs ID N° 79, 82, 83, 85, 87, 88, 89 y 90, que utilizan las cepas MC58 (variante 1), 2996 (variante 2) y M1239 (variante 3).

Un ejemplo de una proteína en tándem cuando $n = 3$ viene dada como SEC ID N° 142.

Ácidos nucleicos

35 Los ácidos nucleicos de la invención pueden emplearse en reacciones de hibridación (por ejemplo en métodos Northern o Southern blot, o en microarrays de ácido nucleico o “chips genéticos”), en reacción de amplificación (por ejemplo PCR, SDA, SSSR, LCR, TMA, NABSA, etc.) y en otras técnicas de ácido nucleico.

40 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar de diversas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química parcial o totalmente, mediante la digestión de polipéptidos largos por nucleasas (por ejemplo restricción de enzimas), a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, a partir de la bacteria en sí misma, etc.

45 Los ácidos nucleicos de la invención pueden tener diversas formas, por ejemplo de cadena simple, cadena doble, vectores, cebadores, sondas, marcados, sin marcar, etc.

Los ácidos nucleicos de la invención son, en la forma preferente, en forma aislada o sustancialmente aislada.

50 La invención incluye ácidos nucleicos con secuencias complementarias a aquellas descritas anteriormente, por ejemplo para las sondas, los antisentidos o para su utilización como cebadores.

El término “ácido nucleico” aquí utilizado incluye ADN y ARN, así como sus análogos, tales que aquellos que contienen esqueletos modificados y también ácidos nucleicos peptídicos (PNA), etc.

55 El ácido nucleico según la invención puede marcarse, por ejemplo, con una marca radioactiva o fluorescente. Esto resulta particularmente práctico cuando el ácido nucleico se utiliza en técnicas de detección de ácido nucleico, por ejemplo, cuando el ácido nucleico es un cebador o como una sonda para su utilización en técnicas como PCR, LCR, TMA, NASBA, etc.

La invención también presenta vectores con las secuencias nucleótidas de la invención (por ejemplo vectores de clonación o expresión, como los aptos para la inmunización de ácido nucleico) y las células huésped transformadas con dichos vectores.

5 Otros componentes antigénicos

Las composiciones de la invención incluyen un pequeño número (por ejemplo menor a t antígenos, donde t es 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3) de antígenos purificados del serotipo B. Es particularmente preferible que la composición no debería incluir complejos o mezclas no definidas de antígenos, por ejemplo, es preferible no incluir vesículas de la membrana externa en la composición. Los antígenos se expresan, preferiblemente, de manera recombinante en un huésped heterólogo y, a continuación, se purifican.

La composición de la invención incluye, al menos, dos proteínas NMB1870 diferentes. También puede incluir otro antígeno Neisseria, como vacuna que dirige más de un antígeno por bacteria disminuye la posibilidad de seleccionar mutantes de escape. Los antígenos Neisseria para su inclusión en las composiciones incluyen proteínas que comprenden:

- (a) Los 446 pares de SECs ID (es decir, 2, 4, 6, ..., 890, 892) descritas en la referencia 6.
- (b) Los 45 pares de SECs ID (es decir, 2, 4, 6, ..., 88, 90) descritas en la referencia 7.
- (c) Los 1674 pares SECs ID 2 – 3020, pares de SECs ID 3040 – 3114 y todas las SECs ID 3115 – 3241 descritas en la referencia 8.
- (d) Las 2160 secuencias aminoácidas de NMB0001 a NMB2160 de la referencia 2.
- (e) Una secuencia aminoácida descrita en las referencias 10, 11 o 12.
- (f) Una variante, un homólogo, un ortólogo, un parólogo, un mutante, etc. de (a) a (e); o
- (g) Una vesícula de la membrana externa preparada a partir de *N. meningitidis* [véase, por ejemplo, la referencia 139].

Además de los antígenos 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:

- Antígenos de *Helicobacte pylori* como CagA [18 a 21], VacA [22, 23], NAP [24, 25, 26], HopX [por ejemplo 27], HopY [por ejemplo 27] y / o ureasa.
- Un antígeno sacárido del serotipo A, C, W135 y / o Y de *N. meningitidis*, como el oligosacárido del serotipo C descrito en la referencia 28 [véase también la referencia 29] o los oligosacáridos de la referencia 30.
- Un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo 31, 32 o 33].
- Un antígeno del virus de la hepatitis A, como los virus inactivos [por ejemplo 34 o 35].
- Un antígeno del virus de la hepatitis B, como los antígenos de superficie y / o nucleares [por ejemplo 35 o 36].
- Un antígeno de difteria, como una anatoxina diftérica [por ejemplo el capítulo 3 de la referencia 37] tal que el mutante CRM₁₉₇ [ejemplo 38].
- Un antígeno tetánico, como una anatoxina tetánica [por ejemplo el capítulo 4 de la referencia 37].
- Un antígeno de *Bordetella pertussis*, como la holotoxina pertussis (PT) y la haemagglutinin filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y / o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo las referencias 39 y 40].
- Un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo 29].
- Un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo 41].
- Un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 6, 7, 8, 42].
- Un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplos las referencias 43 a 49].
- Un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo 50].
- Un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo 51].
- Antígeno(s) de polio [por ejemplo 52, 53] como la IVP.
- Antígeno(s) de rabia [por ejemplo 54] como virus inactivado liofilizado [por ejemplo 55, RabAvertTM].
- Antígenos de sarampión, paperas y / o rubeola [por ejemplo los capítulos 9, 10 y 11 de la referencia 37].
- Antígeno(s) de gripe [por ejemplo el capítulo 19 de la referencia 37], como hemagglutinina y / o proteínas de superficie neuraminidasa.
- Un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo 56].
- Un antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo grupo B) [por ejemplo 57, 58].
- Un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo grupo B).
- Un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo grupo A) [por ejemplo 58, 59, 60].
- Un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo 61].
- Un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo 62, 63 64].
- Un antígeno de un virus de la familia flaviviridae (género flavivirus), como los del virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, los cuatro serotipos del virus del Dengue, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas y el virus del Nilo Occidental.
- Un antígeno de pestivirus, como el del virus de la peste porcina clásica, el virus de la diarrea viral bovina y / o el

virus de la enfermedad de la frontera.

- Un antígeno de parvovirus, por ejemplo del parvovirus B19.
 - Una proteína prión (por ejemplo la proteína priónica de ECJ).
 - Una proteína amiloide, como un péptido beta [65].
- 5 – Un antígeno de cáncer, como los enumerados en la Tabla 1 de la referencia 66 o en las tablas 3 y 4 de la referencia 67.

La composición pueden comprender uno o más de estos antígenos.

- 10 Los antígenos de proteínas tóxicas pueden modificarse cuando sea necesario (por ejemplo desintoxicación de toxina Pertussis mediante dispositivos químicos y / o genéticos [40]).

- 15 Cuando se incluye un antígeno de difteria en la composición, es preferible incluir también un antígeno tetánico y antígenos de Pertussis. Igualmente, cuando se incluye un antígeno tetánico, es preferible incluir también antígenos de difteria y Pertussis. Igualmente, cuando se incluye un antígeno de Pertussis, es preferible incluir también antígenos tetánicos y de difteria. Son preferibles las combinaciones DTP.

- 20 En la forma preferente, los antígenos sácaridos están en forma conjugada. Las proteínas portadoras para los conjugados incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [68], péptidos sintéticos [69, 70], proteínas de choque térmico [71, 72], proteínas de Pertussis [73, 74], proteína D de *H. influenzae* [75], citoquinas [76], linfoquinas [76], proteínas estreptocócicas, hormonas [76], factores de crecimiento [76], toxina A o B de *C. difficile* [77], proteínas de captación del hierro [78], etc. Una proteína portadora preferible es la anatoxina diftérica CRM197 [79].

- 25 Los antígenos de la composición estarán presentes a una concentración de, al menos, 1 µg / ml. En general, la concentración de cualquier antígeno será suficiente para obtener una respuesta inmunológica contra ese antígeno.

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

- Como alternativa a emplear antígenos de proteínas en las composiciones inmunológicas de la invención, pueden utilizarse ácidos nucleicos (preferiblemente ADN, por ejemplo en forma de un plásmido) que codifican al antígeno.

- 35 En la forma preferente, las composiciones de la invención incluyen uno, dos o tres: (a) antígenos sácaridos de los serotipos Y, W135, C y (opcionalmente) A de Meningococo; (b) un antígeno sácarido de *Haemophilus influenzae* de tipo B; y / o (c) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.

Serotipos Y, W135, C y (opcionalmente) A de Meningococo

- 40 Las vacunas contra los serotipos A, C, W135 e Y se conocen desde hace años. Estas vacunas (MENCEVAX, ACWYTM y MENOMUNETM) están basadas en el polisacárido capsular del organismo y, aunque son efectivos en adolescentes y adultos, su respuesta inmunitaria es débil y protegen durante un corto periodo de tiempo y no pueden utilizarse con niños.

- 45 A diferencia de los antígenos de polisacáridos conjugados de estas vacunas, las vacunas recientemente aprobadas del serotipo C (MenjugateTM [80, 28], MeningitecTM y NeisVac – CTM) incluyen sácaridos conjugados. MenjugateTM y MeningitecTM tienen antígenos de oligosacáridos conjugados a un portador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac – CTM utiliza el polisacárido completo (des – O – acetilado) conjugado a un portador de anatoxina tetánica. La vacuna MenActraTM propuesta contiene antígenos sácaridos capsulares conjugados de cada uno de los serotipos Y, W135, C y A.
- 50

- Las composiciones de la presente invención incluyen, en la forma preferente, antígenos sácaridos capsulares de uno o más de los serotipos Y, W135, C y (opcionalmente), A de Meningococo, en el que los antígenos están conjugados a proteína(s) portadora(s) y / o son oligosacáridos. Por ejemplo, la composición puede incluir un antígeno sácarido capsular del serotipo C, de los serotipos A y C, de los serotipos A, C y W135, de los serotipos A, C e Y, de los serotipos C, W135 e Y o de los cuatro serotipos.
- 55

- La cantidad típica de cada antígeno sácarido meningocócico por dosis oscila entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo, 1 µg, 2,5 µg, 4 µg, 5 µg o 10 µg (expresado como sácarido).
- 60

- Cuando una mezcla comprende sácaridos capsulares de los serotipos A y C, la proporción (peso / peso) de sácarido MenA : sácarido MenC puede ser superior a 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior). Cuando una mezcla comprende sácaridos capsulares del serotipo Y y uno, o ambos, de los serotipos C y W135, la proporción (peso / peso) de sácarido MenY : sácarido MenW135 puede ser superior a 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior), y / o la proporción de sácarido MenY : sácarido MenC puede ser inferior a 1 (por ejemplo 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o inferior).
- 65 En la forma preferente, las proporciones (peso / peso) para los sácaridos de los serotipos A:C:W135:Y son 1:1:1:1,

1:1:1:2, 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. En la forma preferente, las proporciones (peso / peso) para los sacáridos de los serotipos 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. Es preferible el empleo de masas sustancialmente similares de cada sacárido.

5 Los sacáridos capsulares se utilizarán normalmente en forma de oligosacáridos. Estos están formados por la fragmentación de polisacáridos capsulares purificados (por ejemplo, por hidrólisis), a lo que sigue la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

10 Preferiblemente, la fragmentación de polisacáridos se lleva a cabo para dar lugar a un grado medio de polimerización (DP) final en los oligosacáridos de menos de 30 (por ejemplo entre 10 y 20, preferiblemente 10 para el serotipo A, entre 15 y 25 para los serotipos W135 e Y, preferiblemente 15 – 20; entre 12 y 22 para el serotipo C, etc). El DP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o por ensayos de colorimetría [81].

15 Si se lleva a cabo hidrólisis, el hidrolisato se dividirá para eliminar los oligosacáridos cortos [29]. Esto puede conseguirse de diversas maneras, como la ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior o igual a 6 se eliminarán para el serotipo A, y los inferiores a 4 se eliminarán para los serotipos W135 e Y.

20 Los antígenos sacáridos MenC preferibles se describen en la referencia 80, como los utilizados en Menjugate™.

El antígeno sacárido puede modificarse químicamente. Esto resulta particularmente práctico para reducir la hidrólisis del serotipo A [82, véase a continuación]. Puede llevar a cabo la des – O – acetilación de sacáridos meningocócicos. Para los oligosacáridos, la modificación puede tener lugar antes o después de una depolimerización.

25 Cuando una composición de la invención incluye el antígeno sacárido MenA, el antígeno es preferiblemente un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo del sacárido nativo ha / han sido reemplazados por un grupo bloqueante [82]. Esta modificación mejora la resistencia a hidrólisis.

30 El número de unidades monosacáridas que cuentan con grupos bloqueantes puede variar. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades monosacáridas pueden tener grupos bloqueantes. De manera alternativa, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de las unidades monosacáridas 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 o 30 unidades monosacáridas pueden tener grupos bloqueantes.

35 Igualmente, el número de grupos bloqueantes en una unidad bloqueante puede variar. Por ejemplo, el número de grupos bloqueantes en una unidad monosacárida puede ser 1 o 2. El grupo bloqueante se encuentra, generalmente, en 3ª y / o 4ª posición de las unidades monosacáridas.

40 La unidad terminal monosacárida puede o no tener un grupo bloqueante en lugar de su hidroxilo nativo. Es preferible conservar un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad terminal monosacárida para intervenir en reacciones futuras (por ejemplo conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos pueden convertirse en grupos amino (– NH₂ o – MH – E, donde E es un grupo protector de hidrógeno) mediante aminación reductiva (utilizando, por ejemplo, NaBH₃CN / NH₄Cl), y, después, pueden regenerarse después de que otros grupos hidroxilo hayan sido convertidos en grupos bloqueantes.

45 Los grupos bloqueantes que reemplazan grupos hidroxilos pueden ser directamente accesibles mediante una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo por otro grupo. Los derivados apropiados de grupos hidroxilo que actúan como grupos bloqueantes son, por ejemplo, carbonatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo éteres de silicio o alquilo) y acetales. Algunos ejemplos específicos de estos 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 son directamente accesible y que pueden reemplazar completamente el grupo hidroxilo incluyen C₁₋₁₂ alquilo, C₁₃₋₁₂ alquilo, C₅₋₁₂ arilo, C₅₋₁₂ arilo – C₁₋₁₆ alquilo, NR¹R² (R¹ y R² se definen en el párrafo siguiente), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂ (C₁₋₆ alquilo), CN, CF₃, CCl₃, etc.

50 En la forma preferente, los grupos bloqueantes son grupos de retirada de electrón.

55 En la forma preferente, los grupos bloqueantes tienen la fórmula: – O – X – Y o – OR³, en la que X es C (O), S(O) o SO₂; Y es C₁₋₁₂ alquilo, C₁₋₁₂ alcoxi, C₃₋₁₂ cicloalquilo, C₅₋₁₂ arilo o C₅₋₁₂ arilo – C₁₋₆ alquilo, pudiendo ser cada uno de ellos sustituido con 1, 2 o 3 grupos independientes seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂ (C₁₋₆ alquilo), CN, CF₃ o CCl₃; o Y es NR¹R²; R¹ y R² son seleccionados independientemente de H, C₁₋₁₂ alquilo, C₃₋₁₂ cicloalquilo, C₅₋₁₂ arilo o C₅₋₁₂ arilo – C₁₋₆ alquilo; o R¹ y R² pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂; R³ es C₁₋₁₂ alquilo, C₃₋₁₂ cicloalquilo, pudiendo ser cada uno de ellos sustituido con 1, 2 o 3 grupos independientes seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂ (C₁₋₆ alquilo), CN, CF₃ o CCl₃; o R³ es C₅₋₁₂ arilo o C₅₋₁₂ arilo – C₁₋₆ alquilo, pudiendo ser cada uno de ellos sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂ (C₁₋₆ alquilo), CN, CF₃ o CCl₃. Cuando R³ es C₁₋₁₂ alquilo o C₃₋₁₂ cicloalquilo, se sustituye con 1, 2 o 3 grupos como se ha definido anteriormente. Cuando R¹ y R² se unen para formar un grupo heterocíclico saturado significa que R¹ y R²

junto al átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ o C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 o 2 heteroátomos (como N, O o S) además del átomo de nitrógeno. Algunos ejemplos de grupos heterocíclicos saturados de C₃₋₁₂ son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperacinilo, imidazolidinilo, acetidinilo y aciridinilo.

Los grupos bloqueantes - O - X - Y y - OR³ pueden prepararse a partir de grupos - OH mediante procedimiento de derivatización estándar, como reacción del grupo hidroxilo con un haluro de ácido, un haluro de alquilo, un haluro de sulfonilo, etc. Por consiguiente, el átomo de oxígeno de - O - X - Y es, preferiblemente, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo - X - Y de - O - X - Y reemplaza, preferiblemente, el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

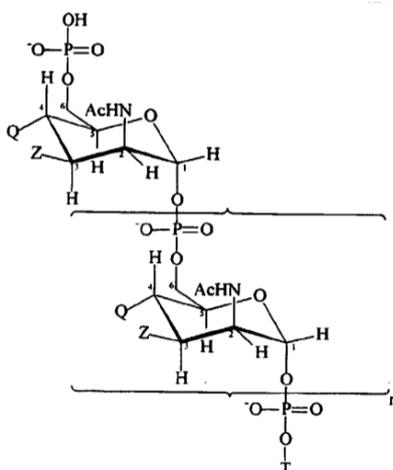
De manera alternativa, los grupos bloqueantes pueden ser accesibles mediante una reacción de sustitución, como una sustitución de Mitsunobu. Estos y otros métodos de preparación de grupos bloqueantes a partir de grupos hidroxilos son ya conocidos.

Más preferiblemente, el grupo bloqueante es - OC(O)CF₃ [83], o un grupo carbomato - OC(O)NR¹R², en el que R¹ y R² son seleccionados independientemente de C₁₋₆ alquilo. Más preferiblemente, R¹ y R² son metilos, es decir, el grupo bloqueante es - OC(O)NMe₂. Los grupos bloqueantes carbomatos tienen un efecto estabilizador en los enlaces glucosídicos y pueden prepararse en condiciones suaves.

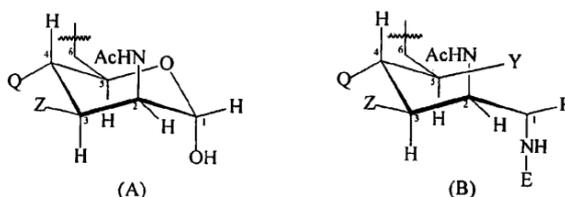
En la forma preferente, los sacáridos MenA modificados contienen *n* unidades monosacáridas, en los que, al menos, el *h* % de las unidades monosacáridas no tienen grupos - OH en ninguna de las posiciones 3 y 4. El valor de *h* es 24 o más (por ejemplo 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100) y es, preferiblemente, 50 o más. Los grupos - OH ausentes son, preferiblemente, grupos bloqueantes de los definidos anteriormente.

Otros sacáridos MenA modificados comprenden unidades monosacáridas, en los que, al menos, *s* unidades monosacáridas no tienen - OH en las posiciones 3 y 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 o 90). Los grupos - OH ausentes son, preferiblemente, grupos bloqueantes de los definidos anteriormente.

Los sacáridos MenA modificados adecuados para su utilización en la presente invención tienen la fórmula:
, en la que



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



Cada grupo Z se selecciona independientemente de OH o de un grupo bloqueante de los descritos anteriormente; y
Cada grupo Q se selecciona independientemente de OH o de un grupo bloqueante de los descritos anteriormente;
Y se selecciona de OH o de un grupo bloqueante de los descritos anteriormente;

E es H o un grupo protector de hidrógeno;
y en la que más del 7 % (por ejemplo 8 %, 9 %, 10 % o más) de los grupos Q son grupos bloqueantes.

Cada uno de los grupos $n + 2$ Z puede ser igual o diferente uno de otro. Igualmente, cada uno de los grupos $n + 2$ Q puede ser igual o diferente uno de otro. Todos los grupos Z pueden ser OH. Alternativamente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de los grupos Z pueden ser OAc. Preferiblemente, aproximadamente el 70 % de los grupos Z son OAc, siendo el resto de grupos Z OH o grupos bloqueantes de los descritos anteriormente. Al menos el 7 % de los grupos Q son grupos bloqueantes. Preferiblemente, al 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 mediante un proceso que conlleva etapas de precipitación de polisacáridos (por ejemplo utilizando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción con fenol frío (para eliminar proteínas) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [por ejemplo la referencia 84]. Un proceso más apropiado [30] incluye, sin embargo, la precipitación de polisacáridos seguida de solubilización de polisacáridos precipitados utilizando un alcohol bajo. La precipitación puede conseguirse gracias a un detergente catiónico como sales de tetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo sales de bromuro), o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Es preferible el uso de bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') [85]. La solubilización de material precipitado puede conseguirse gracias a un alcohol bajo como metanol, propanol, isopropanol, butanol, 2 – butanol, isobutanol, terbutanol, glicoles, etc., pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar complejos CTAB – polisacárido. El etanol se añade, preferiblemente, al polisacárido precipitado para dar una concentración final (basada en el contenido total de etanol y agua) de entre el 50 % y el 95 %.

Tras la resolubilización, el polisacárido puede tratarse para eliminar contaminantes. Esto resulta especialmente importante en situaciones en las que una mínima contaminación es inaceptable (por ejemplo para la producción de vacunas humanas). Este proceso conlleva una o más etapas de filtración, por ejemplo filtración en profundidad, filtración a través de carbón activado, filtración por tamaño y / o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para continuar con el tratamiento y / o el procesado. Esto puede conseguirse mediante intercambio catiónico (por ejemplo añadiendo sales de calcio o sodio).

Como alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares de la presente invención pueden obtenerse mediante síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se describe en la referencia 86 y la síntesis de MenA en la referencia 87.

Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de, al menos, dos serotipos de *N. meningitidis*. Los sacáridos se preparan, preferiblemente, por separado (incluyendo cualquier fragmentación, conjugación, modificación, etc.) y, a continuación, se mezclan para dar una composición de la invención.

Sin embargo, cuando la composición incluye sacáridos capsulares del serotipo A, es preferible que el sacárido del serotipo A no se combine con otro(s) sacárido(s) hasta antes de su uso, para minimizar así el potencial de la hidrólisis. Estos pueden conseguirse convenientemente teniendo el componente del serotipo A (normalmente junto a los excipientes adecuados) en forma liofilizada y el resto de componentes del serotipo en forma líquida (también junto a los excipientes adecuados), utilizando los componentes líquidos para reconstituir el componente liofilizado MenA cuando se vaya a utilizar. Cuando se emplea una sal de aluminio adyuvante, es preferible incluir el adyuvante en el vial que contiene la vacuna líquida, para liofilizar el componente MenA sin adyuvante.

Por consiguiente, una composición de la invención puede prepararse a partir de un kit que contiene: (a) sacárido capsular del serotipo A de *N. meningitidis* en forma liofilizada; y (b) los demás antígenos de la composición en forma líquida. La invención también proporciona un método para preparar una composición de la invención, incluyendo la mezcla del sacárido capsular del serotipo A de *N. meningitidis* liofilizado con el resto de antígenos, en la que dichos antígenos están en forma líquida.

En cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual será de entre 1 µg y 50 µg (medidos en masa de sacárido), siendo preferible 2,5 µg, 5 µg o 10 µg de cada uno. Con proporciones en peso de A:C:W135:Y de 1:1:1:1, 1:1:1:2, 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, además, la cantidad representada por el número 1 es preferiblemente 2,5 µg, 5 µg o 10 µg. Para una proporción 1:1:1:1 de una composición de A:C:W:Y y 10 µg por sacárido, se administran, además, 40 µg de sacárido por dosis. En la forma preferente la composiciones tiene 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

En la forma preferente, las composiciones de la invención comprenden menos de 50 µg de sacárido meningocócico

5 por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 40 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 30 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 25 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 20 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 10 µg de sacárido meningocócico por dosis pero, idealmente, las composiciones de la invención comprenden, al menos, 10 µg de sacárido meningocócico por dosis.

10 Los conjugados Menjugate™ y NeisVac™ emplean adyuvante hidróxido, mientras que Meningitec™ utiliza un fosfato. Las composiciones de la invención pueden adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos asociados a un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes frente a los serotipos, por ejemplo, se encuentran disponibles las siguientes permutaciones:

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

15 Para combinaciones trivalentes de *N. meningitidis*, se encuentran disponibles las siguientes permutaciones:

Serotipo	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 B

20 Cuando la composición incluye un antígeno de *H. influenzae* B, normalmente será un antígeno sacárido capsular Hib. Los antígenos sacárido de *H. influenzae* B ya se conocen.

25 Ventajosamente, el sacárido Hib se conjuga covalentemente a una proteína portadora para mejorar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos en general y del polisacárido capsular Hib en particular, está muy documentada [por ejemplo las referencias 88 a 96, etc.]. La invención puede utilizar cualquier Hib conjugado apropiado. Se describen a continuación proteínas portadoras apropiadas; para los sacáridos Hib, los vehículos preferibles son CRM₁₉₇ ("HbOC"), anatoxinas tetánicas ("PRP – T") y el complejo de membrana externa de *N. meningitidis* ("PRP – OMP").

30 La parte sacárida del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo polirribosil ribitol fosfato (PRP)), pero es preferible hidrolizar polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo MW de 1 a 5 kDa).

35 Un conjugado preferible comprende un oligosacárido Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ mediante una unión de ácido lipídico [97, 98]. Una anatoxina tetánica también es un vehículo preferible.

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

40 Cuando una composición incluye un antígeno sacárido Hib, es preferible que no incluye un hidróxido de aluminio adyuvante. Si la composición incluye un fosfato de aluminio adyuvante, el antígeno Hib puede ser adsorbido por este [99] o puede no ser adsorbido [100].

Los antígenos Hib pueden ser liofilizados, por ejemplo, junto a antígenos meningocócicos.

Streptococcus pneumoniae

45 Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, normalmente será un antígeno sacárido capsular, preferiblemente conjugado a una proteína portadora [por ejemplo las referencias 31 a 33]. Es preferible incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se utilizan con frecuencia mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes, así como vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [101]. Por ejemplo, PrevNav™ [102] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F), estando cada sacárido conjugado individualmente a CRM₁₉₇ mediante aminación reductiva, con 2 µg de cada sacárido por 0,5 ml de dosis (4 µg de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos en un fosfato de aluminio adyuvante. En la forma

preferente, las composiciones de la invención incluyen, al menos, serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden ser adsorbidos en un fosfato de aluminio.

5 Como alternativa al uso de antígenos sacárido para pneumococo, la composición puede incluir uno o más antígenos polipeptídicos. Las secuencias genómicas de varias cepas de pneumococo están disponibles [103, 104] y pueden ser sujeto de la vacuna inversa [105 – 108] para identificar antígenos polipeptídicos apropiados [109, 110]. 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 111.

10 En algunas realizaciones, la composición puede incluir antígenos tanto sacáridos como polipeptídicos de pneumococo. Esta puede emplearse como una simple mezcla o puede conjugarse el antígeno sacárido de pneumococo a una proteína pneumocócica. Las proteínas portadoras apropiadas para dichas realizaciones incluyen los antígenos enumerados en el párrafo anterior [111].

15 Los antígenos pneumocócicos pueden liofilizarse, por ejemplo, junto a antígenos meningocócicos y / o Hib.

Conjugación covalente

20 Los sacáridos capsulares de las composiciones de la invención se conjugan, normalmente, a proteína(s) portadora(s). En general, la conjugación mejora la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte de antígenos T – independientes en antígeno T – dependientes, permitiendo de este modo la inducción de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente práctica para su uso en vacunas pediátricas y es una técnica ya conocida [por ejemplo repasada en las referencias 11 y 88 – 96].

25 Las proteínas portadoras preferibles son toxinas y anatoxinas bacterianas, como la anatoxina diftérica o tetánica. Es preferible la toxina diftérica mutante de CRM₁₉₇ [79, 113, 114]. Otras proteínas portadoras aceptables incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [68], péptidos sintéticos [69, 70], proteínas de choque térmico [71, 72], proteínas de Pertussis [73, 74], citoquinas [76], linfoquinas [76], hormonas [76], factores de crecimiento [76], proteínas artificiales con múltiples epítopos de células T + CD4 humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [115], proteína D de *H. influenzae* [75, 116], proteína de superficie pneumocócica PspA [117], proteínas de captación del hierro [78], toxina A o B de *C. difficile* [77], etc. En la forma preferente, los vehículos con anatoxina diftérica, anatoxina tetánica, proteína D de *H. influenzae* y CRM₁₉₇.

35 En una composición de la invención, es posible utilizar más de una proteína portadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de supresión del portador. Por consiguiente, las proteínas portadoras pueden utilizarse para diferentes serotipos, por ejemplo, los sacáridos del serotipo A pueden conjugarse a CRM₁₉₇, mientras los sacáridos del serotipo C pueden conjugarse a anatoxinas tetánicas. También es posible utilizar más de una proteína portadora para un antígeno sacárido en particular, por ejemplo, los sacáridos del serotipo A pueden estar en dos grupos, algunos conjugados a CRM₁₉₇ y otros conjugados a anatoxinas tetánicas. Sin embargo, en general es preferible emplear la misma proteína portadora para todos los sacáridos.

40 Una única proteína portadora puede portar más de un antígeno sacárido [118]. Por ejemplo, una única proteína portadora puede haber conjugado sacáridos de los serotipos A y C. Para conseguir esto, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general es preferible tener conjugados separados para cada serotipo.

45 En la forma preferente, los conjugados con un sacárido : proteína tienen una proporción (peso / peso) de entre 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido). Son preferibles las proporciones entre 1:2 y 5:1 y más preferibles las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Es preferible un exceso de proteína portadora para MenA y MenC.

50 Los conjugados pueden utilizarse en conjunción con proteínas portadoras libres [119]. Cuando una proteína portadora dada se presenta como libre y como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es, preferiblemente, inferior al 5 % de la cantidad total de proteína portadora en la composición total, y más preferiblemente inferior al 2 % en peso.

Puede emplearse cualquier reacción de conjugación apropiada, con cualquier enlace de unión necesario.

60 El sacárido se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede conllevar, por ejemplo, reactivos de cianilación como CDAP (por ejemplo 1 – ciano – 4 – dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [120, 121]). Otras técnicas apropiadas emplean carbodiimidias, hidrácidos, ésteres activos, norbornano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción de la referencia 94).

65 Los enlaces mediante grupo de enlace puede llevarse a cabo empleando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 122 y 123. Un tipo de enlace conlleva la aminación reductiva del polisacárido, acoplado el grupo amino resultante a un extremo de un grupo de enlace de ácido adípico

y, a continuación, acoplado una proteína al otro extremo del grupo de enlace de ácido adípico [92, 124, 125]. Otros enlaces incluyen B – propionamido [126], nitrofenil – etilamina [127], haloacil haluro [128], enlaces glucosídicos [129], ácido 6 – aminocaproico [130], ADH [131], partes C₄ a C₁₂ [132], etc. Como alternativa a la utilización de un enlace, puede utilizarse un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden incluir oxidación del polisacárido seguida de aminación reductiva con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 133 y 134.

Es preferible un proceso en el que se introduzcan los grupos amino en el sacárido (por ejemplo reemplazando los grupos =O terminales con – NH₂) seguido de derivatización con un diéster adípico (por ejemplo diéster de ácido adípico N – hidroxisuccinimida) y de una reacción con la proteína portadora. Otra reacción preferible utiliza activación CDAP con una proteína portadora D, por ejemplo para MenA o MenC.

Tras la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Hay numerosos métodos, incluyendo la cromatografía hidrofóbica, la ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las referencias 135 y 136, etc.].

Vesículas de la membrana externa

Es preferible que las composiciones de la invención no incluyan complejos o mezclas indefinidas de antígenos, algo característico de las OMVs. Sin embargo, una de las maneras en las que se puede aplicar la invención a las OMVs es cuando las OMVs se administran en series de dosis múltiples.

Cuando se administra más de una OMV, cada dosis puede ser suplementada (ya sea añadiendo la proteína purificada o por la expresión de la proteína en la bacteria de la que derivan las OMVs) por la primera, segunda o tercera proteína como se describió anteriormente. Preferiblemente, las dosis diferentes se suplementan con diferentes variantes de NMB1870. En una serie de tres dosis de OMV, por ejemplo, cada dosis podría contener una primera proteína, una segunda proteína y una tercera proteína diferente de manera que, tras recibir las tres dosis de OMVs, se habrían recibido las tres variantes. En una serie de dos dosis de OMV, se podría utilizar una variante por dosis de OMV (omitiendo, por tanto, una variante), o una o ambas dosis de OMV podrían suplementarse con más de una variante para cubrir las tres variantes. En la forma preferente de realización, hay tres dosis de OMV y cada una contiene tras poblaciones de vesículas modificadas genéticamente diferentes, cada una con tres subtipos, dando de este nueve subtipos diferentes en total.

Este planteamiento puede utilizarse, en general, para mejorar las preparaciones de microvesículas del serotipo B [137] de *N. meningitidis*, “OMVs nativas” [138], ampollas o vesículas de la membrana externa [por ejemplo las referencias 139 a 144, etc.]. Estas pueden prepararse a partir de bacterias que han sido genéticamente manipuladas [145 – 148] para, por ejemplo, aumentar la inmunogenicidad (por ejemplo hiperexpresión de genes), reducir la toxicidad, inhibir la síntesis de polisacáridos capsulares, regular a la baja la expresión de PorA, etc. Pueden prepararse a partir de cepas con excesiva formación de *blebs* [149 – 152]. Pueden incluirse vesículas de un *Neisseria* no patógeno [153]. Las OMVs pueden prepararse sin utilizar detergentes [154, 155]. Pueden expresar proteínas no neisséricas en su superficie [156]. Pueden ser pobres en liposacáridos. Pueden mezclarse con antígenos recombinantes [139, 157]. Pueden utilizarse vesículas de bacterias con diferentes subtipos de proteína de membrana externa I, por ejemplo seis subtipos diferentes [158, 159] que utilizan dos poblaciones de vesículas genéticamente modificadas diferentes, cada una con tres subtipos, o nueve subtipos diferentes que utilizan tres poblaciones de vesículas genéticamente modificadas diferentes, cada una con tres subtipos, etc. Los subtipos apropiados incluyen: PI.7,16; PI.5 – 1, 2 – 2; PI.19, 15 – 1; PI.5 – 2,10; PI.12 – 1,13; PI.7 – 2,4; PI.22,14; PI.7 – 1,1; PI.18 – 1,3,6.

También es posible, por supuesto, suplementar las preparaciones de vesículas con dos o tres variantes diferentes.

Inmunización

La composición de la invención es, preferiblemente, una composición inmunogénica, y la invención presenta una composición inmunogénica de la invención para su utilización como medicamento.

La invención es práctica en un procedimiento para obtener una respuesta anticuerpo en un mamífero, comprendiendo la administración de una composición inmunogénica de la invención al mamífero. La respuesta anticuerpo es, preferiblemente, respuesta anticuerpo protectora y / o bactericida.

La invención es práctica en un procedimiento para proteger a un mamífero con una infección por *Neisseria* (por ejemplo meningocócica), comprendiendo la administración al mamífero de una composición inmunogénica de la invención.

La invención también presenta la utilización de, al menos, dos antígenos (a) y (b) como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para prevenir la infección por *Neisseria* en un mamífero.

El mamífero es preferiblemente humano. El humano puede ser un adulto o, preferiblemente, un niño.

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

5 Los usos y procedimientos resultan particularmente prácticos para prevenir / tratar enfermedades que incluyen de manera no limitante meningitis (en particular meningitis bacteriana) y bacteremia.

10 La eficacia del tratamiento terapéutico puede probarse analizando la infección por *Neisseria* tras la administración de la composición de la invención. La eficacia del tratamiento profiláctico puede probarse analizando las respuestas inmunes contra NMB1870 tras la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede ser determinada administrándolas para probar sujetos (por ejemplo niños de 12 a 16 meses, o modelos animales [160]) y luego determinando parámetros estándar que incluyen anticuerpos de suero bactericida (SBA) y títulos por ELISA (GTM) de la avidéz de IgG anti - capsula. Estas respuestas inmunes se determinan, normalmente, unas 4 semanas después de la administración de la composición y se comparan a los valores determinados antes de la administración de la composición. Es preferible un incremento de SBA de, al menos, 4 u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, puede realizarse más de un análisis post administración.

20 En la forma preferente, las composiciones de la invención pueden conferir a un paciente un título de anticuerpo superior a los criterios de seroprotección de cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Se conocen antígenos con un título de anticuerpo asociado en el que un huésped se considera seroconvertido contra el antígeno, y dichos títulos son publicados por organizaciones como la OMS. Preferiblemente más del 80 % de una muestra estadísticamente significantes de sujetos ha seroconvertido, más preferiblemente más del 90 %, más preferiblemente más del 93 % y aún más preferiblemente del 96 % al 100 %.

30 Las composiciones de la invención se administran, en general, directamente al paciente. La administración directa puede llevarse a cabo mediante inyección parenteral (por ejemplo de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido), o por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auricular, pulmonar u otra administración muscular. Es preferible la administración intramuscular en el muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede realizarse con una aguja (por ejemplo una aguja hipodérmica), pero también puede realizarse de manera alternativa la inyección sin aguja. La dosis típica intramuscular es de 0,5 ml.

35 La invención puede utilizarse para obtener inmunidad sistémica y / o mucosa.

40 El tratamiento puede ser una única dosis o una serie de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden utilizarse como serie de inmunización primaria y / o como serie de dosis de refuerzo. Una serie primaria puede estar seguida de una serie de refuerzo. El período de tiempo adecuado entre las dosis primarias (por ejemplo entre 4 y 16 semanas) y entre las primarias y el refuerzo puede determinarse de manera rutinaria.

45 La composición inmunogénica de la invención incluye, generalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser cualquier sustancia que no induce por sí misma la producción de anticuerpos nocivos al paciente que recibe la composición, y que puede administrarse sin demasiada toxicidad. Los vehículos adecuados son numerosos, macromoléculas metabolizadas lentamente como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivos. Dichos vehículos son ya conocidos para los expertos en la disciplina. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos como agua, solución salina, glicerol y etanol. También pueden estar presentes en estos vehículos sustancias auxiliares como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras de pH y similares. Los liposomas también son vehículos adecuados. En la referencia 161 se exponen meticulosamente los vehículos farmacéuticamente aceptables.

55 Las infecciones por *Neisseria* afectan a diversas áreas del cuerpo, por eso la composición de la invención se puede preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, como soluciones líquidas o en suspensión. También pueden prepararse en forma sólida apta para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como tableta, cápsula o jarabe (se puede añadir sabor de manera opcional). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como inhalador, utilizando un polvo fino o un spray. La composición puede prepararse como un supositorio o un pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, auricular u ocular, por ejemplo, como gotas.

60 La composición es, preferiblemente, estéril. Está, preferiblemente, libre de pirógenos. Está, preferiblemente, tamponada, por ejemplo, con un pH de entre 6 y 8, generalmente alrededor de 7. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, es preferible utilizar un tampón de histidina [162]. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas respecto a los humanos.

65

Las composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de inmunogen, así como tantos otros componentes específicos como sean necesarios. Por "cantidad inmunológicamente efectiva" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una única dosis o como parte de una serie, es efectiva como tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y la condición física del individuo que se trate, la edad, el grupo taxonómico del individuo (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, la valoración de la situación médica por parte del médico tratante y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad descienda en un amplio rango para que puede ser determinada mediante ensayos rutinarios. El tratamiento pos dosis puede ser una única dosis o una serie de dosis múltiples (por ejemplo incluyendo dosis de refuerzo). La composición puede administrarse junto a otros agentes inmunoreguladores.

Una composición inmunogénica incluye, generalmente, un adyuvante. Los adyuvantes preferidos que mejoran la efectividad de la composición incluyen de manera no limitante: (A) MF59 (5 % Squalene, 0,5 % Tween 80 y 0,5 % Span 85, formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador) [véase el capítulo 10 de la referencia 163; véase también la referencia 164]; (B) micropartículas (es decir, una partícula de ~ 100 nm a ~ 150 µm de diámetro, más preferiblemente de ~ 200 nm a 30 µm de diámetro y, más preferiblemente, de ~ 500 nm a 10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales biodegradables y no tóxicos (es decir, un poli (ácido alfa-hidroxi), un ácido polihidroxi-butírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), siendo preferible un poli (láctico-co-glicólico) ("PLG"), opcionalmente con una superficie cargada (por ejemplo añadiendo un detergente catiónico, aniónico o noiónico, como SDS (negativo) o CTAB (positivo) [por ejemplo las referencias 165 y 166]); (C) liposomas [véanse los Capítulos 13 y 14 de la referencia 163]; (D) ISCOMs [véase el Capítulo 23 de la referencia 163]; (E) SAF, con un 10 % Squalene, 0,4 % Tween 80, 5 % polímero de bloque plurónico L121 y thr – MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrónica o vortexado para generar una emulsión de partículas de mayor tamaño [véase el Capítulo 12 de la referencia 163]; (F) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) con un 2 % Squalene, 0,2 % Tween 80 y un componente, o más, de la pared celular bacteriana del grupo formado por monofosforilípido A (MLP), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MLP + CWS (Detox™); (G) adyuvantes saponinas, como QuilA o QS21 [véase el capítulo 22 de la referencia 163], también conocidas como Stimulon™; (H) quitosano [véase 168]; (I) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (J) citoquinas, como interleucinas (por ejemplo IL – 1, IL – 2, IL – 3, IL – 4, IL – 5, IL – 6, IL – 7, IL – 12, etc.), interferones (por ejemplo interferón – γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc [véanse los Capítulos 27 y 28 de la referencia 163], RC529; (K) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL – 12 (y, opcionalmente, un esteroide) [169]; (L) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3 – O – deacilado (3dM) [por ejemplo el capítulo 21 de la referencia 163]; (M) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y / o emulsiones de aceite en agua [170]; (N) oligonucleótidos con motivos CpG [171], es decir, que contienen, al menos, un dinucleótido CpG, utilizando opcionalmente 5 – metilcitosina en lugar de citoquina; (O) un éter de polietileno o un éster de polietileno [172]; (P) un éster de polioxietileno de sorbitano surfactante junto a un octoxinol [173] o un éter o éster de polioxietileno de alquilo surfactante junto a, al menos, otro surfactante no iónico adicional como un octoxinol [174]; (Q) un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo un oligonucleótido CpG) y una saponina [175]; (R) un inmunoestimulador y una partícula de sal metálica [176]; (S) una saponina y una emulsión de aceite en agua [177]; (T) enterotoxina termolabil de *E. coli* ("LT") o mutantes desintoxicados de la misma, como los mutantes K63 o R72 [por ejemplo el Capítulo 5 de la referencia 38]; (U) toxina del cólera ("CT") o mutantes desintoxicados del mismo [por ejemplo el Capítulo 5 de la referencia 38]; (V) ARN de doble cadena; (W) sales de aluminio, como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidrofosfatos), sulfato de aluminio, etc [Capítulos 8 y 9 de la referencia 163] o sales de calcio, como fosfato de calcio; y (X) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para mejorar la efectividad de la composición [véase, por ejemplo, el Capítulo 7 de la referencia 163]. Para la inmunización parenteral son preferibles los adyuvantes de sales de calcio (fosfatos de aluminio y, en particular, hidroxifosfatos y / o hidróxidos y, particularmente, oxihidróxido) y MF59. Los mutantes tóxicos son adyuvantes mucosos preferibles. QS21 es otro adyuvante útil para NMB1870 que puede emplearse solo o junto a cualquiera de (A) a (X) como, por ejemplo, con una sal de aluminio. Las composiciones de la reivindicación 1 incluyen una sal de aluminio adyuvante. Los péptidos múridos incluyen N – acetil – muramil – L – treonil – D – isoglutamina (thr – MDP), N – acetil – nomuramil – L – alanil – D – isoglutamino (nor – MDP), N – acetilmuramil – L – alanil – D – isoglutaminil – L – alanina – 2 – (1' – 2' – dipalmitoil – sn – glicero – 3 – hidroxifosforiloxi) – etilamina (MTP – EP), etc.

Expresión proteica

Las técnicas de expresión bacteriana son conocidas en la disciplina. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse con ARN polimerasa bacteriana y de iniciar la transcripción "corriente abajo" (3') de una secuencia codificante (por ejemplo gen estructural) en el ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que, normalmente, se encuentra próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción suele incluir un sitio de unión de ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano puede también incluir una segunda región llamada operador, que puede solapar un sitio de unión de ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), como una proteína de gen represor que puede enlazar el operador y, por tanto, inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva puede tener lugar en ausencia de elementos

reguladores negativos, como el operador. Además, la regulación positiva puede lograrse mediante una secuencia de proteína de enlace de un gen activador que, cuando está presente, es una proteína activadora por catabolitos (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón *lac* en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al., (1984) Annu. Rev. Genet. 18 : 173]. La expresión regulada puede, por lo tanto, ser positiva o negativa, aumentando o reduciendo de este modo la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias de promotor útiles. Entre los ejemplos se incluyen secuencias de promotor derivados de enzimas que metabolizan azúcares, como galactosa, lactosa (*lac*) [Chang et al., (1977) Nature 198 : 1056] y maltosa. Algunos ejemplos adicionales incluyen secuencias de promotor derivadas de enzimas biosintéticas como triptófano (*trp*) [Goeddel et al., (1980) Nucl. Acids Res. 8 : 4057; Yelverton et al., (1981) Nucl. Acids Res. 9 : 731; patente US 4,738,921; EP – A – 0036776 y EP – A – 0121775]. Los promotores beta lactamasa (*bla*) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." En *Interferon 3* (de. I. Gresser)], bacteriófago lambda [Shimatake et al., (1981) Nature 292 : 128] y T5 [patente US 4,689,406] también proporcionan secuencias promotoras útiles. Otro promotor interesante es un promotor de arabinosa inducible (pBAD).

Además, los promotores sintéticos que no tienen lugar en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o bacteriófago pueden unirse con las secuencias de operón de otro promotor bacteriano o bacteriófago, creando así un promotor híbrido sintético [patente US 4,551,433]. Por ejemplo, el promotor *lac* es un promotor híbrido *trp – lac* que comprende tanto promotor *trp* como secuencias de operón *lac*, reguladas por el represor *lac* [Amann et al., (1983) Gene 25 : 167; de Boer et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir de manera natural promotores de origen no bacteriano que tiene la capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor natural de origen no bacteriano puede también acoplarse a ARN polimerasa compatible para producir niveles más altos de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema ARN polimerasa bacteriófago T7 / promotor es un ejemplo de un sistema acoplado [Studier et al., (1986) J. Mol. Biol. 189 : 113; Tabor et al., (1985) Proc Natl. Acad. Sci. 82 : 1074]. Además, un promotor híbrido también puede estar compuesto de un promotor bacteriófago y una región operadora de *E. coli* (EPO – A – 0267851).

Además de la secuencia promotora funcional, un sitio de unión de ribosomas también es útil para la expresión de genes extraños en procariontes. En *E. coli*, el sitio de unión de ribosomas se denomina secuencia Shine – Dalgarno (SD) e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3 a 9 nucleótidos localizada de 3 a 11 nucleótidos arriba del codón de inicio [Shine et al., (1975) Nature 254 : 34]. La secuencia SD favorece la unión de ARNm al ribosoma mediante el apareamiento de bases entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNm 16S de *E. coli* [Steitz et al., (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." En *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (de. R. F. Goldberg)]. Para expresar genes eucariotes y procariontes con sitios de unión de ribosomas débiles [Sambrook et al., (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*." En *Molecular Cloning: A laboratory Manual*].

Una secuencia promotora puede estar unida directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido del extremo N – Terminal siempre será una metionina, codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina del extremo N – Terminal puede ser desprendida de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o por incubación, tanto *in vivo* como *in vitro*, con una peptidasa de N – Terminal de metionina bacteriana (EP – A – 0219237).

Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por bacterias son regiones reguladoras localizadas en el extremo 3' del codón de terminación de la traducción, y, por tanto, junto al promotor que flanquea la secuencia codificante. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede ser traducido al polipéptido codificado por el ADN. Las secuencias de terminación de la transcripción suelen incluir secuencias de ADN de unos 50 nucleótidos, capaces de formar estructuras tallo – lazo que ayudan a terminar la transcripción. Algunos ejemplos incluyen secuencias de terminación de la transcripción derivadas de genes con promotores fuertes, como el gen *trp* en *E. coli* y otros genes biosintéticos.

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, incluyendo un promotor, la secuencia de señal (si se desea), la secuencia codificante de interés y la secuencia de terminación de la transcripción, se unen en constructos de expresión. Los constructos de expresión son, a menudo, conservados en un replicón, como un elemento extracromosómico (por ejemplo plásmidos) capaz de mantenerse estable en un huésped, como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo así que se mantenga en un huésped procarionte o para la expresión, clonación o amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido de alto o bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias tiene, en general, un número de copias que oscila entre 5 y 200 y suele estar en 10 y 150. Un huésped que contenga un plásmido de alto número de copias contendrá, preferiblemente, al menos 10 y, más preferiblemente, al menos 20 plásmidos. Puede seleccionarse tanto un vector de alto número de copias como de bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña del huésped.

Alternativamente, los constructos de expresión pueden integrarse en el genoma bacteriano con un vector integrativo. Los vectores integrativos suelen contener, al menos, una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite

al vector integrarse. Las integraciones parecen ser resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores integrativos constructos con ADN de diversas cepas de *Bacillus* integran el cromosoma del *Bacillus* (EP – A – 0127328). Los vectores integrativos también pueden estar compuestos de secuencias de bacteriófagos o transposones.

Normalmente, los constructos de expresión extracromosómica e integrativa pueden contener marcadores seleccionables que permitan seleccionar las cepas bacterianas que han sido transformadas. Los marcadores seleccionables pueden expresar en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que vuelven a la bacteria resistente a fármacos como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina) y tetraciclina [Davies et al., (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32 : 496]. Los marcadores seleccionables pueden también incluir genes biosintéticos, como los que existen en las secuencias biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

Alternativamente, algunos de los componentes anteriormente descritos, pueden estar juntos en vectores de transformación. Los vectores de transformación suelen estar compuestos de un marcador seleccionable que se mantiene en un replicón o se desarrolla en un vector integrativo, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de expresión y transformación, tanto replicones extracromosómicos como vectores de integración, se ha desarrollado para la transformación en numerosas bacterias. Por ejemplo, los vectores de expresión se han desarrollado para, *inter alia*, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* [Palva et al., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5582; EP – A – 0036259 y EP – A – 0063953; WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake et al., (1981) *Nature* 292 : 128; Amann et al., (1985) *Gene* 40 : 183; Studier et al., (1986) *J. Mol. Biol.* 759 : 113; EP – A – 0036776, EP – A – 0136829 y EP – A – 0136907], *Streptococcus cremoris* [Powell et al., (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 655]; *Streptococcus lividans* [Powell et al., (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 655], *Streptomyces lividans* [patente US 4,745,056].

Los procedimientos de introducción de ADNs exógenos en huésped bacterianos se conocen en la disciplina y, normalmente, incluyen la transformación de bacterias tratadas con CaCl_2 u otros agentes, como cationes divalentes y DMSO. El ADN también puede introducirse en células bacteriana por electroporación. Los procedimientos de transformación varían según la especie de la bacteria que se va a transformar. Véase por ejemplo [Masson et al., (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60 : 213; Palva et al., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5582; EP – A – 0036259 y EP – A – 0063953; WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55 : 856; Wang et al., (1990) *J. Bacteriol.* 772 : 949, *Campylobacter*], [Cohen et al., (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69 : 2110; Dower et al., (1988) *Nucleic Acids Res.* 76 : 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 and S. Nicosia); Mandel et al., (1970) *J. Mol. Biol.* 53 : 159; Takeo (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949 : 318; *Escherichia*], [Chassy et al., (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44 : 173 *Lactobacillus*]; [Fiedler et al., (1988) *Anal. Biochem.* 770 : 38, *Pseudomonas*]; [Augustin et al., (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66 : 203, *Staphylococcus*], [Barany et al., (1980) *J. Bacteriol.* 744 : 698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, in: *Streptococcal Genetics*" (ed. J. Ferretti and R. Curtiss III); Perry et al., (1981) *Infect. Immun.* 32 : 1295; Powell et al., (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 655; So kuti et al., (1987) *Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology* 7 : 412, *Streptococcus*].

General

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

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

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

"Identidad de secuencia" se determina, preferiblemente, por el algoritmo de Smith – Waterman como se utilizó en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda por huecos afines con los parámetros *gap open penalty* = 12 y *gap extension penalty* = 1.

Tras el serotipo, la clasificación meningocócica incluye serogrupo, serosubtipo y, después, inmunotipo, y la nomenclatura estándar los clasifica como serotipo, serogrupo, serosubtipo e inmunotipo, cada uno separado por un colon, por ejemplo B : 4 : P1,15: L3, 7, 9. En el serotipo B, algunas cepas causan, a menudo, enfermedades (hiperinvasiva), algunas cepas causan formas más severas de enfermedad que otras (hipervirulenta), y otras no causan casi enfermedades. Se conocen siete cepas hipervirulentas, llamadas subtipo I, III y IV – I, complejo ET – 5, complejo ET – 37, cúmulo A5 y cepa 3. Estas han sido definidas por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero también se ha utilizado tipificación multilocus de secuencias (MLST) para clasificar [referencia 16]. Los cuatro grupos hipervirulentos principales son los complejos ST32, ST44, ST8 y ST11.

El término “alquilo” se refiere a los grupos alquilo tanto de cadena recta como de cadena ramificada. El grupo alquilo puede verse interrumpido por 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por – O – , – NH – o – S –. El grupo alquilo puede también verse interrumpido por 1, 2 o 3 enlaces dobles y / o triples. Sin embargo, el término “alquilo” se refiere, normalmente, a grupos alquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos o interrupciones de enlaces dobles o triples. Cuando se hace referencia a alquilo de C₁₋₁₂, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). De manera similar, cuando se hace referencia a alquilo de C₁₋₆, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

El término “cicloalquilo” incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalquileo, así como combinaciones de los mismo con grupos alquilo, como grupos cicloalquilo. El grupo cicloalquilo puede verse interrumpido por 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por – O – , – NH – o – S –. Sin embargo, el término “cicloalquilo”, normalmente, se refiere a grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos. Algunos ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C₃₋₁₂, se entiende 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).

El término “arilo” aquí utilizado se refiere a un grupo aromático como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a arilo de C₅₋₁₂, se entiende 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).

El término “C₅₋₁₂ arilo – C₁₋₆ alquilo” se refiere a grupos como bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

Los grupos protectores del nitrógeno incluyen grupos sililo (como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (como ftalimidas, trifluoroacetamidas, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t – butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), 9 – fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2 – (trimetilsililo) etoxi carbonil, 2, 2, 2 – tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (como β – trimetilsililetanosulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, C₁₋₁₂ alquilo, bencilo, benzhidrol, tritil, 9 – fenilfluorenil, etc. Un grupo protector del nitrógeno preferido es Fmoc.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la secuencia nucleótida de la región corriente arriba de NMB1870.

La Figura 2 es una representación esquemática de la estructura de proteínas TbpB y de antígenos NMB2132 y NMB1870. Se indican los péptidos señal y las regiones proximales ricas en glicina. Se indican cinco cajas conservadas por diferentes motivos y sus posiciones están mapeadas en la secuencia proteínica.

La Figura 3 muestra el incremento de los niveles de NMB1870 en *N. meningitidis* MC58 durante la curva de crecimiento.

La Figura 4 muestra el incremento de los niveles de NMB1870 en el sobrenadante en el mismo período. Los niveles de PorA y NMB1380 no incrementan. Los números sobre las líneas se refieren a la OD_{620nm} del cultivo. KO indica un mutante *knockout* NMB1870 de MC58, y Wcl se mantiene para el control del lisado de células.

La Figura 5 muestra OMVs probadas con anti – NMB1870.

La Figura 6 muestra análisis FACS de MC58 encapsulado o un mutante MC58 no encapsulado utilizando anti – NMB1870.

La Figura 7 es un Western blot de un gradiente de geles SDS – PAGE cargado con lisados celulares de altos (líneas 1 y 2), medios (3 y 4) y bajos (5 y 6) expresores NMB1870. La línea 7 contiene un NMB1870 *knockout* de MC58. Las líneas son: (1) MC58; (2) H44 / 76; (3) NZ394 / 98; (4) 961 – 5945; (5) 67 / 00; (6) M1239; (7) MC58nmb1870.

La Figura 8 muestra FACS y títulos bacterianos para cada expresador alto, medio y bajo y también para el NMB1870 *knockout*. Los expresores medio y bajo tienen secuencias aminoácidas NMB1870 idénticas, con un 91,6 % de emparejamiento con MC58.

La Figura 9 es un dendrograma que muestra el grupo de cepas según las distancias de la proteína NMB1870. Las etiquetas “1”, “2” y “3” indican las tres variantes. Los números en los corchetes indican el número de cepas con secuencia idénticas presentes en cada rama del dendrograma. Se indican las razas hipervirulentas, seguidas del número de cepas cuando este es diferente del número total. Los serotipos diferentes de B también se muestran. Las cepas de tres tipos (MC58, 961 – 5965 y M1239) y otras cepas utilizadas en el análisis serológico están en círculos.

La Figura 10 es una secuencia de alineación de la variante 1 (MC58), la variante 2 (961 – 5945) y la variante 3 (M1239). Los números aminoácidos comienzan a partir de la cisteína que se supone el primer aminoácido de la

proteína madura. Los fondos gris y negro indican residuos conservados e idénticos, respectivamente.

La Figura 11 muestra análisis FACS de suero contra la variante 1 (primera fila), la variante 2 (segunda fila) y la variante 3 (tercera fila), utilizando la cepa de la variante 1 (MC58), la variante 2 (961 – 5945) y la variante 3 (M1239). El suero de control contra el polisacárido capsular se muestra en la fila 4 (anticuerpo monoclonal Seam3). El suero de control contra una proteína citoplasmática se muestra en la fila 5 (anti – NMB1380). La fila 6 contiene los mutantes *knockout* (KO) de cada cepa, probada con antisuero homólogo.

La Figura 12 (variante 1), 13, (variante 2), y 14 (variante 3) muestran dendrogramas para tres variantes separadas de NMB1870, clasificados por tipos multilocus de secuencias (ST).

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

NMB1870 en la cepa MC58 del serotipo B – identificación del codón de inicio

El gen NMB1870 se identificó en las secuencias genómicas de MenB y MenA publicadas por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR) y el Sanger Center, respectivamente [2, 4; NMB1870 y NMA0586]. Sin embargo, hay una discrepancia sobre la posición de codón de inicio ATG como el codón de inicio MenB es 120bp corriente arriba del codón de inicio MenA. En contraste a ambas anotaciones de trabajos anteriores, la presente invención sitúa el codón de inicio como un codón GTG que está corriente abajo de los codones de inicio del trabajo anterior (18bp corriente abajo para MenA, 138bp para MenB) y coincide con la referencia 8.

Como se muestra en la Figura 1, el codón de inicio GTG (+1) es consistente con la presencia de un sitio de unión de ribosomas correctamente separado y con la predicción de la señal lipoprotéica. El codón de inicio MenB del trabajo anterior de TIGR se muestra en una caja, y el codón de inicio de Sanger se muestra en un círculo. Los repetidos invertidos se muestran por flechas horizontales.

NMB1870 es un gen monocistrónico localizado 157 bases corriente abajo del codón de terminación del gen *nmb1869* fructosa-bifosfato aldolasa. En MenA Z2491 la organización global es similar, pero 31 pares de bases (bp) corriente arriba del codón de inicio GTG hay una inserción de 186 nucleótidos que son homólogos a una región interna de repetición de IS1106 y están flanqueadas por dos pares de 16 bases repetidas invertidas. Un sitio de unión supuesta de ribosomas (matizado) está presente 8 bp corriente arriba del codón de inicio GTG. Una caja *fur* (11 / 19 emparejamientos con el consenso de caja *fur* de *E. coli* [178], SECs ID N° 74 y 75) se localiza 35 bp corriente arriba del codón de inicio, como se predijo con los FindPatterns GCG de inicio de la SEC ID N° 75 y permite un máximo de nueve malemparejamientos. Las secuencias promotoras supuestas también fueron detectadas.

Se utilizó la suite GCG Wisconsin Package (version 10.0) para el análisis de secuencia por ordenador de las secuencias génicas y protéicas. El programa PSORT [179] se utilizó para la predicción de la localización. NMB1870 tiene la señal típica de una lipoproteína de superficie expuesta, caracterizada por un péptido señal con un motivo caja - lipo del tipo – Lu – X – X – Cys – , donde la Cisteína estaba seguida de Serina, un aminoácido asociado generalmente con la localización de la membrana externa de lipoproteínas [180]. La caja - lipo se pierde en el gonococo debido a una inserción de base única desplazada (G) tras el nucleótido 36 de MC58, reestableciendo este desfase por una inserción 8 bp tras la posición 73.

La proteína madura MC58 se predice como una lipoproteína con un peso molecular de 26.964 Da y un pI de 7,96, y se caracteriza por la presencia de cuatro glicinas corriente abajo del motivo caja - lipo.

Un segundo análisis de predicción de estructura secundaria utilizando el programa PredictProtein [181] indica que NMB1870 es una proteína globular compuesta, en su mayoría, de beta – láminas.

Análisis de secuencia

Se utilizó el algoritmo PSI – BLAST para búsquedas por homología [182] empleando bases de datos de proteínas no redundantes. No se encontró ninguna proteína no homóloga al buscar bases de datos de proteínas eucariotas y procariotas existentes no redundantes en NCBI, incluyendo el genoma humano, sugiriendo así que NMB1870 es específico para *Neisseria*. Sin embargo, se encontró una región con algo de homología (28 % de identidad para 146 aminoácidos) con la parte C – Terminal de la proteína de unión de la transferrina TfbA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* [183] (Figura 2). Una vista más cercana de esta región reveló homologías también con las proteínas de unión de la transferrina de *N. meningitidis* [184], *H. influenzae* [185], *Moraxella catarrhalis* [186] y con el antígeno de superficie NMB2132 de *N. meningitidis*, anteriormente anotado como homólogo TbpB [3].

Para ver si esta homología de secuencia refleja una homología funcional, se dializaron recombinante NMB1870 (véase a continuación), transferrina humana hTF (Sigma T – 4132) y la mezcla de los dos (concentración final de 7 µM) O / N en PBS a 4 °C. Tras la diálisis de 20 µl de cada proteína y la mezcla de ellas, se cargaron en una columna de gel de filtración (Amersham) HPLC Superdex 200 PC 3,2 / 30 utilizando PBS como tampón [187]. Se utilizaron Blue Dextran 2000 y ribonucleasa A, quimiotripsina A, ovalbúmina A y suero bovino de albúmina (amersham) con

pesos moleculares estándar para calibrar la columna. El gel de filtración se realizó mediante un sistema Smart con una velocidad de flujo de 0,04 ml / min y el material eluido se analizó a 214 nm y 280 nm. (El volumen de retención NMB1870 fue 1,68 ml y 1,47 para htf.)

5 La proteína recombinante no se unió a la transferrina humana *in vivo*.

La caja Fur en el promotor sugiere que la expresión de NMB1870 puede regularse con hierro. Sin embargo, la expresión de la proteína no parece incrementar en condiciones de hierro bajo.

10 Una característica interesante de la proteína es la presencia de un segmento de cuatro glicinas corriente abajo de la cisteína lipidada. Se encuentran tres o más glicinas consecutivas corriente abajo de una cisteína lipidada también en otras cinco lipoproteínas de *N. meningitidis*, llamadas proteína B de unión de la transferrina (TbpB), componente de la membrana externa de un transportador ABC de NMB0623, proteína hipotética NMB1047, homólogo de TbpB de NMB2132 y lipoproteína AspA [188]. En ninguna de estas proteínas la secuencia poli – glicina está codificada por
15 una prolongación poli – G, sugiriendo que esta característica no suele generar modulación antigénica.

Una búsqueda de lipoproteínas con una región rica en glicina se llevó a cabo en 22 secuencias genómicas completas recuperadas en NCBI [189] utilizando FindPatterns. La búsqueda recuperó 29 lipoproteínas en algunas pero no en todas las especies bacterianas. Los organismos con este tipo de lipoproteínas incluyen tanto bacterias Gram negativas como Gram positivas, incluyendo *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Lysteria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, mientras otras como *E. coli*, *Bacillus subtilis*,
20 *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* y *Vibrio cholerae* no tenían ninguna. La mayoría de las lipoproteínas con esta señal pertenecen a transportadores ABC, seguidos de proteínas de función desconocida. Aunque esta característica común de la estructura primaria sugiere un papel común para las glicinas repetidas, la
25 función es desconocida. Sin embargo, puede servir para guiar las lipoproteínas a una ruta específica de secreción y localización de superficie [190].

Secuenciación para otras cepas

30 Se seleccionaron 70 cepas representativas de la diversidad genética y geográfica de la población de *N. meningitidis* para una investigación más profunda de NMB1870. Las cepas derivan de 19 países diferentes, el 73 % pertenecen al serotipo B y 32 se aislaron durante los últimos cinco años. El grupo de cepas incluye, en su mayoría, cepas del serotipo B, algunas cepas de los serotipos A, C, Y, W135 y Z y una cepa de *N. gonorrhoeae* y *N. cinerea*. Las cepas se describen más detalladamente en las referencias 191 y 192. Algunas cepas se encuentran disponibles en ATCC
35 (por ejemplo la cepa MC58 está disponible bajo la referencia Baa – 335).

El gen NMB1870 se amplificó utilizando cebadores externos a la secuencia codificadora (A1, SEC ID N° 55; y B2, SEC ID N° 56). Aproximadamente 10 ng de AND cromosómico se empleó como plantilla para la amplificación. Las
40 condiciones de PCR fueron: 30 ciclos, 94 °C durante 40", 58 °C durante 40" y 68 °C durante 40". Los fragmentos de PCR se purificaron por el kit Qiagen QIAquick PCR Purification y se sometieron a análisis de secuencia, que se llevó a cabo empleando ABI 377 Automatic Sequencer. La secuenciación se llevó a cabo utilizando primers A1, B2, 22 (SEC ID N° 57) y 32 (SEC ID N° 58).

45 El gen se detectó por PCR en las 70 cepas de *Neisseria*. En *N. lactamica* se podría haber detectado un ligamiento mediante un Western blot, pero el gen no podría haberse amplificado.

La secuencia nucleótida del gen se determinó en las 70 cepas. Se codificaron un total de 23 proteínas diferentes (SEC ID N° 1 a 23). El análisis por ordenador de estas 23 secuencias, utilizando el algoritmo de Kimura y Jukes – Cantor, las dividió en tres variantes (Figura 9). El dendrograma se obtuvo comenzando el alineamiento de secuencia
50 múltiple de las secuencias protéicas de NMB1870 (PileUP) utilizando el método Protein Sequence Parsimony Method (ProtPars), un programa disponible en el pack Phylogeny Inference (Phylip) y se confirmó con el programa GCG program Distances, utilizando los algoritmos de Kimura y Jukes – Cantor.

Se determinaron las secuencias de NMB1870 de otras 100 cepas. Muchas de ellas eran idénticas a una de las SECs ID N° 1 a 23, pero 19 secuencias únicas se presentan como las SECs ID N° 140 a 158.

Las figuras 12 a 14 muestran dendrogramas de varias secuencias, clasificadas por tipos de multilocus de secuencias ST. En la variante 1 (Figura 12) la cepa referencia es MC58, siendo la identidad de secuencia más baja con la
60 referencia de 89,4 % contra una media del 93,7 %. En la variante 2 (Figura 13) la cepa referencia es 2996 y las secuencias tienen un 93,4 % de identidad (media de 96,3 %). En la variante 3 (Figura 14) la identidad más baja respecto a la cepa referencia M1239 es 94,7 % (media de 95,8 %). ST32cpx es el grupo hipervirulento más homogéneo, albergando solo una secuencia NMB1870 de la variante 1 (también solo una forma de NMB1343 y de NadA). La mayoría de cepas ST44cpx albergan la variante 1 (varias secuencias diferentes) de NMB1870, algunas con 3 variantes (secuencia única). Estos datos sugieren que ST32cpx está próximo a ST44cpx, en comparación a
65 otros grupos, que coinciden con los datos basados en el genotipo de PorA (clase III). Los complejos ST11 y ST8 se representan casi siempre por secuencias diferentes en la variante 2 de NMB1870, sugiriendo que estos complejos

ES 2 436 747 T3

están cercanos, en comparación a otros grupos, y coinciden con el genotipo de PorA (calse II). ST11cpx alberga las tres variantes, indicando que es el grupo hipervirulento más diverso de los cuatro.

5 Se seleccionaron arbitrariamente las cepas MC58, 961 – 5945 y M1239 como cepas para las variantes 1, 2 y 3, respectivamente. La identidad de secuencia entre los tres tipos de cepas se muestra en la Figura 10. La identidad aminoácida fue de 74,1 % entre las variantes 1 y 2, 62,8 % entre las variantes 1 y 3 y 84,7 % entre las variantes 2 y 3. Las secuencias en las que cada variante estaba bien conservada, la más distante muestra 916, %, 93,4 % y 93,2 % de identidad respecto a sus cepas, respectivamente. *N. cinerea* pertenece a la variante 1, y comparte un 96,7 % de homología con MC58. Como se muestra en la Figura 9, la variante 1 alberga todas las cepas de las líneas ET – 5
10 hipervirulentas, la mayoría de las líneas de las 3 razas, las cepas del serotipo A, dos aislados reciente de W135 y uno de ET – 37. La variante 2 alberga todas las cepas del complejo hipervirulento A4, de los serotipo Y y Z, un antiguo aislado w135 y cinco cepas de ET – 37. La variante 2 alberga cuatro únicas cepas ST, una cepa de Et – 37, una línea de cepa 3 y gonococo.

15 Las cepas de cada grupo y sus secuencias NMB1870 son las siguientes:

1	<p>gbl85 (secuencia compartida con ES14784, M.00.0243291) m4030 (secuencia compartida con M3812) m2197 m2937 iss1001 (secuencia compartida con NZ394/98, 67/00, 93/114, bz198, m1390, nge28, 14996, 65/96, ISS1120, S59058, ISS1017, ISS1043, ISS1026, ISS1102, ISS1106, ISS656, ISS678, ISS740, ISS749, ISS995, ISS845, ISS1167, ISS1157, ISS1182, M4717, M6094, D8273) Inpl7592 (secuencia compartida con 00 – 241341, 00 – 241357, 2ND80, 2ND221, ISS1142) f6124 (secuencia compartida con 205900) m198/172 (secuencia compartida con bz133, gb149, nm008, nm092, ES14963, FN131218, S5902, S90307, M4105, ISS1180, FN131345) mc58 (secuencia compartida con 30/00, 39/99, 72/00, 95330, bz169, bz83, cu385, h44/76, ml 590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44/89, 14847, ES14898, Inpl5709, Inpl7391, Inp17503, FN131654, M3985, S590104, S9029, S9097, D8346, FN131682, ISS832, 1SS648, ISS1067, ISS1071, ISS1159) FN131217 ES14933 GB0993 M6190 F19324 ISS1113 gb0345 (secuencia compartida con M1820, ISS1082) M0445</p> <p style="text-align: right;">17 secuencias, 98 cepas</p>
2	<p>L93/4286 m2671 961-6945 (secuencia compartida con 2996, 96217, 312294, 11327, a22, ISS1141, ISS1173, ISS759, ISS743, ISS866, F17094, NMB, SWZ107) gb013 (secuencia compartida con e32, m1090, m4287, 66094, M3153, M4407, NGH36) 860800 (secuencia compartida con 599) 95N477 (secuencia compartida con 90-18311, c11, m986, F370/85, M.00.0243143, ISS838, ISS839, ISS1092, M1569) 1000 (secuencia compartida con m1096, M2552, M4458, M5149, M6208) m3279 (secuencia compartida con bz232, dk353, m3697, ngh38, M5258, D8221) MK82 8047 C4678 ISS1133 NG6/88 M0579 F16325</p> <p style="text-align: right;">15 secuencias, 56 cepas</p>
3	<p>16889 m3813 m1239 ngpl65 gb355 (secuencia compartida con m3369, D8300, gb0364, M2441) gb988 [fa1090 gonococo]</p>

7 secuencias, 11 cepas

NB: la abreviatura "gb" al principio de una cepa significa "M.01.0240".

Las SECs ID N° 139 (cepa 220173i), 140 (cepas gb101 y ISS908) y 141 (cepa nge31) están distantes de estas tres variantes (al igual que, en menor grado, la cepa m3813).

- 5 En la variante 1, se ha visto la secuencia de la cepa Inp17592 (también se ha visto en las cepas 00 – 241341, 00 – 241357, 2ND80, 2ND221 e ISS1142) en el serotipo W135 Haji. En las cepas Haji, la secuencia NadA (SEC ID N° 143) es una recombinación de los alelos 2 y 3 [191, 192].

Clonación, expresión y purificación en *E. coli*

- 10 Se amplificaron los genes de NM1870 por PCR a partir de las cepas MC58, 961 – 5945 y M1239 del genoma de *N. meningitidis*. Los cebadores hacia adelante e inversos se diseñaron para amplificar la secuencia codificadora de nmb1870 desprovista de la secuencia codificadora para el péptido líder supuesto. Las variantes M1239 y 961 – 5945 se encontraron no expresables en *E. coli*. Por lo tanto, se expresaron añadiendo al extremo N – Terminal la
- 15 secuencia SEC ID N° 46, presente en la proteína gonocócica pero ausente en el equivalente meningocócico. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Cepas	Hacia adelante	Inverso
MC58	CGCGGATCCC <u>ATATGGTCGCCGCCGACATCG</u> ("For1"; SEC ID N° 47)	CCCGCTCGAGTTGCTTGGCGGCAAGGC ("Rev1"; SEC ID N° 48)
961 – 5945	CGCGGATCCC <u>ATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCT</u> <u>GCAGCAGCGGAGGGTCCGCCGCCGACATCGG</u> ("For2"; SEC ID N° 49)	CCCGCTCGAGCTGTTTGGCGGCGATGCC ("Rev2"; SEC ID N° 50)
M1239	CGCGGATCCC <u>ATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCT</u> <u>GCAGCAGCGGAGGGGAGGGGGTGGTGTCCC</u> ("For3"; SEC ID N° 51)	GCCCAAGCTTCTGTTTGGCGGCGATGCC ("Rev3"; SEC ID N° 52)

- 20 Los sitios de restricción, correspondientes a *NdeI* para los cebadores hacia adelante y a *XhoI* (*HindIII* para M1239) para los cebadores inversos, están subrayados. Para los cebadores hacia adelante 961 – 5945 y M1239, la parte de secuencia gonocócica está en cursiva y las secuencias meningocócicas coincidentes de NMB1870 están en negrita.

- 25 Las condiciones de PCR en el caso de la combinación de cebador For1 / Rev1 fueron: desnaturalización a 94 °C durante 30", hibridación a 57 °C durante 30", extensión a 68 °C durante 1 min (5 ciclos), desnaturalización a 94 °C durante 30", hibridación a 68 °C durante 30", extensión a 68 °C durante 1 min (30 ciclos). En el caso de las combinaciones de cebadores: For2 / Rev2, For3 / Rev2 y For3 / Rev3: 94 °C durante 30", 68 °C durante 1 min (5 ciclos), 94 °C durante 30", 71 °C durante 30", 68 °C durante 1 min (30 ciclos).

- 30 El gen completo nmb1870 se amplificó a partir del genoma de MC58 utilizando los siguientes cebadores: f-IFor (CGCGGATCCCATATGAATCGAACTGCCTTCTGCTGCC; SEC ID N° 53) y f-IRev (CCCGCTCGAGTTATTGCTTGGCGGCAAGGC; SEC ID N° 54) y las siguientes condiciones: 94 °C durante 30", 58 °C durante 30", 72 °C durante 1 min (30 ciclos).

- 35 La PCR se llevó a cabo en aproximadamente, 10 ng de ADN cromosómico utilizando High Fidelity Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Los productos de PCR fueron diferidos con *NdeI* y *XhoI* y clonados en los sitios *NdeI* / *XhoI* depET – 21b + vector de expresión (Novagen).

- 40 Las proteínas recombinantes se expresaron como fusiones His – tag en *E. coli* y se purificaron con MCAC (Cromatografía de Afinidad a Metales), como se describió anteriormente [3] y se utilizó para inmunizar ratones para obtener antisuero. Se utilizó *E. coli* DH5α para las clonaciones y BL21 (DE₃) para la expresión.

Mutantes isogénicos nmb1870 y siaD

- 45 Los mutantes isogénicos *knockout* en los que se truncó el gen nmb1870 y se reemplazó con un casete antibiótico de eritromicina, se prepararon transformando las cepas MC58, 961 – 5945 y M1239 con el plásmido pBSΔnmb1870ERM. Este plásmido contiene el gen resistente a la eritromicina en las regiones corriente arriba y corriente abajo de nmb1870 de 500bp. Estas regiones se amplificaron a partir del genoma de MC58 utilizando los siguientes nucleótidos: Ufor GCTCTAGACCAGCCAGGCGCATAC (SEC ID N° 59, *XbaI* sitio subrayado); URev TCCCCCGGGGACGGCATTTTGTTTACAGG (SEC ID N° 60, *SmaI* subrayado); DFor TCCCCCGGGGCGCAAGCAATAAACATTG (SEC ID N° 61, *SmaI* subrayado) y Drev CCCGCTCGAGCAGCGTATCGAACCATGC (SEC ID N° 62, *XhoI* subrayado). Se generó una cápsula mutante

deficiente utilizando el mismo enfoque. El gen *siaD* se eliminó y se reemplazó con *ermC* utilizando el plásmido pBSΔCapERM. Las regiones corriente arriba y corriente abajo de 1000 bp y 1056 bp, respectivamente, se amplificaron a partir del genoma de MC58 utilizando los siguientes cebadores: UCapFor GCTCTAGATTCTTTCCC GAACTCTC (SEC ID N° 63, *XbaI* subrayado); UcapRev TCCCCCGGGCCCGTATCATCCACCAC (SEC ID N° 64, *SmaI* subrayado); DCapFor TCCCCCGGGGATCCACGCAATACCCC (SEC ID N° 65, *SmaI* subrayado) y DCapRev CCCGCTCGAGATATAAGTGG GACGGA (SEC ID N° 66, *XhoI* subrayado). Los fragmentos amplificados se clonaron en pBluescript y se transformaron en cepa MC58 naturalmente competente de *N. meningitidis*. La mezcla se colocó en una placa de agar GC, incubada durante 6 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ y, a continuación, se diluyó en PBS y se esparció en placas de agar GC que contienen 5 µg / ml de eritromicina. La delección del gen *nmb1870* en las cepas MC58Δ*nmb1870*, 961 – 5945Δ*nmb1870* y M1239Δ*nmb1870* se confirmó por PCR; la falta de expresión de NMB1870 se confirmó mediante un análisis de Western blot. La delección del gen *siaD* y la falta de expresión capsular en la cepa MC58Δ*siaD* se confirmaron mediante PCR y FACS, respectivamente.

Lipoproteínas

Para investigar la lipidación de NMB1870, se testó la incorporación de palmitato de la cepa BL21 (DE₃) de *E. coli* recombinante que lleva la longitud completa del gen *nmb1870* tal y como se describe en la referencia 193.

Las cepas meningocócicas MC58 y MC58Δ*nmb1870* fueron cultivadas en un medio GC y marcadas con ácido palmítico (Amersham) [9,10³ – H]. Las células del cultivo de 5 ml se lisaron por ebullición durante 10 min se centrifugaron a 13.000 rpm. Se precipitaron los sobrenadantes con TCA y se lavaron dos veces con acetona fría. Se suspendieron las proteínas en 50 µl de SDS al 1,0 % y se analizaron 15 µl por SDS –PAGE se manchó con azul brillante de Coomassie, se fijó y se empapó durante 15 minutos en una solución de Amplify (Amersham). Los geles se expusieron en Hyperfilm MP (Amersham) a -80 °C durante tres días.

Se detectó en MC58 una banda radioactiva del peso molecular apropiado, pero no se detectó en el mutante *knockout* Δ*nmb1870*. El recombinante de *E. coli* cultivado en presencia de ácido palmítico [9, 10⁻³ - H] - también produce una banda radiactiva en el peso molecular esperado, confirmando que la *E. coli* reconoce el motivo de lipoproteína y añade una cola lipídica a la proteína recombinante.

Detección de la proteína

Se cultivó la cepa MC58 a 37 °C con un 5 % de CO₂ en un medio GC en una fase estacionaria. Se recogieron muestras durante el crecimiento (OD_{620nm} 0,05 - 0,9). Se cultivó MC58Δ*nmb1870* hasta una OD_{620nm} de 0,5. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en varios volúmenes de PBS con el fin de estandarizar los valores de OD. El sobrenadante del cultivo se filtró usando un filtro de 0,2 µm y se precipitó 1 ml mediante la adición de 250 µl de ácido tricloroacético al 50 % (TCA). La muestra se incubó en hielo durante 2 horas, se centrifugó durante 40 min a 4 °C y se lavó el pellet con etanol helado al 70 %, y se resuspendió en PBS. 3 µl de cada muestra (que corresponde a una OD_{620nm} de 0,03) se cargó luego en geles de poliacrilamida al 12 % y se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa.

Los análisis de *Western Blot* se realizaron según los procedimientos estándar, utilizando anticuerpos policlonales generados contra la proteína expresada en *E. coli*, a una dilución 1 : 1000, seguida de una dilución 1 / 2000 de IgG anti - humana marcada con HPR (Sigma). La exploración se realizó utilizando un software de LabScan y un software de Imagemaster (Pharmacia).

Como se muestra en la Figura 3, se detectó una proteína de ~ 29,5 kDa en los extractos de células totales de *N. meningitidis*. La cantidad de proteína en el lisado celular se duplicó aproximadamente durante la curva de crecimiento, mientras que la densidad óptica del cultivo incrementó desde una OD_{620nm} de 0,05 hasta una OD_{620nm} de 0,9. Se detectó también una banda del mismo tamaño en el sobrenadante del cultivo. No se detectó la proteína en el sobrenadante del cultivo recientemente inoculado (OD_{620nm} de 0,05), y se incrementó cuatro veces durante el crecimiento, de una OD_{620nm} de 0,1 a una OD_{620nm} de 0,9 (Figura 4, panel a la izquierda). Se confirmó la verdadera naturaleza de la expresión en el sobrenadante por pruebas de las mismas muestras de las bulas de la membrana y las proteínas citoplasmáticas. Como se muestra en el panel central de la Figura 4, la ausencia de PorA en las preparaciones de sobrenadante de PorA, se descarta una posible contaminación con las bulas de la membrana, mientras que la ausencia en el sobrenadante de la proteína citoplasmática NMB1380 confirmó que las muestras de sobrenadante no se derivan de la lisis celular (panel derecho).

La cepa *knockout* MC58Δ*nmb1870* no muestra ninguna proteína en cualquier lisado celular o en el sobrenadante del cultivo (áreas "KO" en las Figuras 3 & 4).

Se detectó NMB1870 por transferencia Western en vesículas de membrana externa, confirmando que la proteína se segrega con las fracciones de la membrana de *N. meningitidis* (Figura 5). Sin embargo, los sueros de ratones inmunizados con los OMVs no reconocen el NMB1870 recombinante en la transferencia Western, lo que sugiere que la proteína no es inmunogénica en las preparaciones de OMV.

Los análisis FACS utilizados en los anticuerpos anti - NMB 1870 confirmaron que la proteína está expuesta en la superficie y es accesible a los anticuerpos tanto en cepas de *N. meningitidis* encapsuladas y no encapsuladas (Figura 6). Los análisis FACS utilizaron una citometría de flujo de FACS -Scan, con el anticuerpo ligado detectado que utiliza un anticuerpo secundario anti - ratón (molécula completa) conjugado con FITC (Sigma). Los controles de FACS positivos utilizados en SEAM3, un mAb específico para el polisacárido capsular del meningococo B [194], el control negativo consistió en un antisuero policlonal en un ratón contra la proteína citoplasmática NMB1380 [195].

El análisis de transferencia Western de 43 cepas mostró que el NMB1870 se expresa en todas las cepas testadas. Como se muestra en la Figura 7, no obstante, los niveles de expresión variaban considerablemente de cepa a cepa. Las cepas testadas podrían clasificarse como expresadores altos, medios y bajos:

Cepas	Alto	Medio	Bajo
ET5	9 / 9	0 / 9	0 / 9
Linaje 3	7 / 9	1 / 9	1 / 9
ET37	2 / 3	1 / 3	0 / 3
A4	0 / 4	2 / 4	2 / 4
Otro	6 / 15	7 / 15	2 / 15
<i>N. gonorrhoeae</i>	0 / 1	0 / 1	1 / 1
<i>N. cinerea</i>	0 / 1	0 / 1	1 / 1
<i>N. lactamica</i>	1 / 1	0 / 1	0 / 1
Total	25 / 43 (58 %)	11 / 43 (25,5 %)	7 / 43 (16,5 %)

La mayoría de las cepas de linajes hipervirulentos (ET - 5, linaje 3, ET - 37) expresaron altos niveles de proteína , con la excepción de A4, donde dos cepas expresaron niveles medios y dos expresaron niveles bajos. Curiosamente, la proteína se expresó a un alto nivel por cepas que se han utilizado clásicamente como las cepas de vacuna de OMV. No se encontraron patrones genéticos obvios para predecir la cantidad de proteína expresada en cada cepa. Incluso la presencia del elemento IS en la región promotora que se encontró en un 8 / 70 de las cepas (una perteneciente al serotipo A, tres del linaje 3 y cuatro de las clasificados como otros), no mostraron ninguna correlación con la expresión de la proteína .

El experimento de Western blot mostró que la diferencia en la expresión entre alto e medio, medio y bajo o alto y bajo puede ser de dos, cinco y nueve veces, respectivamente. No hay ninguna razón aparente para los diferentes niveles de expresión, y el análisis de las secuencias de ADN aguas arriba del gen no mostró ninguna característica que se correlacione con la expresión.

Respuestas de los anticuerpos

Se analizaron sueros de sujetos sanos y convalecientes para los anticuerpos anti - NMB1870 por *Western blot*. Se cargó NMB1870 purificada (1 µg / área) en geles de poli(acrilamida) de SDS al 12,5 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La proteína unida se detectó con dilución de suero 1 / 2000, seguido de una dilución 1 / 2000 de IgG anti - humana marcado con HPR (Sigma). Mientras que sólo 2 / 10 de los sueros es de personas sanas reconocieron NMB1870, 21 / 40 de los convalecientes reconocieron la proteína, lo que lleva a la conclusión de que el NMB1870 es inmunogénico durante la infección *in vivo*. Por lo tanto, los antisueros de ratones inmunizados con NMB1870 recombinante se investigaron más a fondo.

Para preparar antisueros, se utilizaron 20 µg de proteínas recombinantes de NMB1870 de variante , variante 2 y la variante 3 para inmunizar a seis semanas de edad, los ratones hembra CD1 (Charles River). Se utilizaron entre dos y cuatro ratones por grupo. Las proteínas recombinantes se administraron por vía intraperitoneal junto con adyuvante completo de Freund (CFA) para la primera dosis y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) para la segunda (día 21) y tercera (35 días) dosis de recuerdo. Se realizó el mismo programa de inmunización utilizando adyuvante de hidróxido de aluminio (3 mg / ml) en lugar de adyuvante de Freund . Las muestras de sangre para el análisis se tomaron el día 49.

Los antisueros se testaron para determinar su capacidad para inducir la muerte mediada por el complemento de las cepas *N. meningitidis* encapsuladas, tal como se describe anteriormente [3, 196] utilizando una mezcla de suero de gazapos (Cedarlane) utilizada como fuente de complemento. El suero de un adulto sano (sin actividad bactericida intrínseca cuando se testó en una concentración final del 25 % o 50 %) también se utilizó como fuente de complemento. Los títulos bactericidas séricos se definieron como la dilución de suero que resulta en una disminución del 50 % en las unidades formadoras de colonias (CFU) por ml después de 60 minutos. La incubación de las bacterias con la mezcla de reacción en comparación con el control de CFU por ml en tiempo 0. Típicamente , las bacterias incubadas con el anticuerpo de control negativo en presencia de complemento, mostraron un incremento del 150 % al 200% en CFU / ml durante los 60 min de la incubación .

Se seleccionaron para el ensayo las cepas representativas de los expresores altos, intermedios y bajos. La expresión diferencial de la proteína en la superficie de las cepas seleccionadas se confirmó por el análisis FACS

(Figura 8) del MC58, se eliminó un representante de las cepas del expresor alto con una alta eficiencia por el suero diluido hasta 1 / 64.000; NZ394/98 (originalmente NZ98/254), se eliminó también un representante de los expresadores intermedios con una alta eficiencia por el suero diluido hasta 1 / 16.000 e incluso la cepa 67 / 00, se eliminó un representante de las cepas del expresador bajo por el antisuero diluido hasta 1 / 2048. Las cepas de control, en el que el gen nmb1870 había sido noqueado, no se eliminó por el mismo antisuero.

Para confirmar si los sueros también fueron capaces de conferir protección *in vivo*, se testaron para demostrar si se puede inducir una protección pasiva en el modelo de rata infante. Las ratas infantas de cinco días de edad fueron pre-tratadas por vía intraperitoneal con antisueros anti - NMB1870 o con anticuerpos monoclonales anti - PorA en el tiempo 0 y se inoculó dos horas más tarde por vía intraperitoneal con 5×10^3 de CFU / rata de MenC 4243 (OAc - positivo) o MenB NZ394/98. Los hemocultivos cuantitativos se obtuvieron 24 horas después. Los recuentos bacterianos en los hemocultivos (UFC / ml, medios geométricos) se obtuvieron mediante placas de agar sangre o chocolate. El suero del control positivo fue un anti - PorA (P1.2) para MenC y SEAM3 para MenB. Los resultados de los experimentos fueron los siguientes :

Pre - tratamiento	Cepa inoculada 4243		Cepa inoculada NZ394/98	
	Positivos	CFU / ml x 103	Positivos	CFU / ml x 103
PBS	5 / 5	450	-	-
Suero de control negativo	5 / 5	500	9 / 14	1260
Suero de control positivo	1 / 5	0,003	0 / 7	< 0,001
Anti - NMB1870	0 / 9	< 0,001	0 / 14	< 0,001

Por lo tanto no se recuperaron colonias bacterianas de la sangre de las ratas pasivamente inmunizadas con suero anti- NMB1870, mientras que la mayoría de los animales de control negativo fueron bacteriémicos.

La actividad bactericida es una variante específica

Cada tipo de variante se expresó en *E. coli* como una proteína marcada con His y se utilizó para inmunizar ratones. Se utilizaron los sueros para testar la reactividad cruzada inmunológica entre las cepas de las tres variantes por FACS y el ensayo bactericida. Como se muestra en la figura 11, mediante el análisis FACS, se reconocieron todas las cepas en cada suero, aunque el grado de reconocimiento varió considerablemente, por lo general refleja la homología del aminoácido entre las proteínas.

En un análisis más detallado, el suero anti - variante - 1 (Figura 11, primera fila) reconoció muy bien la cepa MC58 (como se esperaba), en un grado inferior a la cepa 961 - 5945 (74,1 % de identidad) , en menor medida, la cepa M1239 (62,8 % de identidad). Se descubrió una tendencia similar para los antisueros frente a las variantes 2 y 3 (filas 2 y 3 de la Figura 11), aunque con el suero anti- variante - 2, las diferencias no fueron tan sorprendentes.

Un anticuerpo monoclonal contra la cápsula reconoció igualmente las tres cepas (fila 4), mientras que un suero contra la proteína citoplasmática NMBL380 utilizada como control negativo no reconoce ninguna (fila 5). Del mismo modo, los mutantes *knockout* nmb1870 no se reconocieron por ningún suero (fila 6) .

Las diferencias en inmunoreconocimiento entre las variantes fueron más evidentes por el ensayo bactericida:

Suero	MC58 (variante 1)	961 / 5945 (variante 2)	M1239 (variante 3)
Anti - variante 1	64000	256	< 4
Anti - variante 2	< 4	16000	128
Anti - variante 3	< 4	2048	16000

Los datos muestran que el suero contra cada variante fue capaz de inducir una eliminación eficiente mediada por el complemento de la cepa homóloga (títulos que oscilan entre 16.000 y 64.000), mientras que la actividad era baja (128 - 2.048) o ausente (< 4) contra las cepas de las otras variantes. Como se predijo a partir de la cercana homología de aminoácidos, los títulos bactericidas cruzados entre las variantes 2 y 3 fueron más altos que los otros. Cuando se utilizó el complemento humano, los títulos bactericidas de 4096, 256 y 512 se obtuvieron con las variantes 1, 2 y 3, respectivamente, utilizando las cepas de tipo homólogo. No se detectaron títulos se contra las cepas heterólogas.

Proteínas híbridas y proteínas tándem

Las proteínas híbridas y las proteínas en tándem pueden representarse por la fórmula: NH₂ - A- [-X - L -]_n - B - COOH. Se construyeron genes que codifican diversas proteínas de este tipo, donde n = 2 , los N -terminales de X₁ y X₂ se eliminan hasta el extremo de sus regiones de poli -glicina, y - L₂ - y - B - están ausentes (u otro B es una etiqueta de poli - histidina utilizada para la purificación). La siguiente tabla muestra los componentes de estas proteínas en sus formas maduras, y da la SEC ID N^oS del polipéptido completo, la SEC ID N^oS y cepas para las

secuencias de los componentes A, X₁, L₁ y X₂:

	SEC ID	A	X ₁	L ₁	X ₂	pl
(1)	79	-	MC58 (SEC ID 80)	SEC ID 78	2996 (SEC ID 81)	6,74
(2)	82	-	MC58 (SEC ID 80)	SEC ID 144	2996 (SEC ID 81)	6,63
(3)	83	-	MC58 (SEC ID 80)	SEC ID 78	M1239 (SEC ID 84)	
(4)	85	-	MC58 (SEC ID 80)	SEC ID 144	M1239 (SEC ID 84)	
(5)	87	SEC ID 86	2996 (SEC ID 81)	SEC ID 78	M1239 (SEC ID 84)	6,44
(6)	88	SEC ID 86	2996 (SEC ID 81)	SEC ID 144	M1239 (SEC ID 84)	6,35
(7)	89	SEC ID 86	M1239 (SEC ID 84)	SEC ID 78	2996 (SEC ID 81)	
(8)	90	SEC ID 86	M1239 (SEC ID 84)	SEC ID 144	2996 (SEC ID 81)	
(9)	91	Cys	"936" (SEC ID 76)	SEC ID 78	2996 (SEC ID 81)	
(10)	92	Cys	"936" (SEC ID 76)	SEC ID 144	2996 (SEC ID 81)	
(11)	93	Cys	"936" (SEC ID 76)	SEC ID 78	M1239 (SEC ID 84)	
(12)	94	Cys	"936" (SEC ID 76)	SEC ID 144	M1239 (SEC ID 84)	

De estos doce proteínas, por lo tanto, ocho son proteínas NMB1870 en tándem (MW ~ 55 kDa) y cuatro son proteínas híbridas con '936₂₉₉₆' en el extremo N-terminal (MW ~ 49 kDa). Se utilizaron dos enlazadores: (a) la SEQ ID N° 78 , que se deriva del homólogo NMB1870 gonocócico (SEC ID N° 46) y (b) un enlazador rico en glicina (SEQ ID N° 144). Se utilizó también la SEC ID N° 78 en el extremo N-terminal de las proteínas maduras, sin sus dos residuos BamH1 N-terminal (Gly-Ser) es decir; la SEQ ID N° 86.

Las doce proteínas eran solubles cuando se expresaron en *E. coli* y, tras de la purificación, se utilizaron para inmunizar a los ratones. Las respuestas de los anticuerpos bactericidas en suero (SBA) se evaluaron con cuatro cepas de meningococo, asegurando una de cada una de las tres variantes NMB1870 1 a 3 (mostrado como superíndices). El adyuvante fue bien un CFA (arriba) bien un hidróxido de aluminio (abajo):

Proteína	SBA			
	2996 ⁽²⁾	MC58 ⁽¹⁾	M1239 ⁽³⁾	961/5945 ⁽²⁾
(1)	4096	262144	2048	32768
	1024	32768	128	2048
(2)	8192	262144	2048	32768
	1024	16384	512	1024
(3)	—	131072	32768	4096
	—	32768	4096	1024
(4)	—	262144	32768	8192
	—	32768	1024	512
(5)	512	<4	4096	32768
	1024	16	4096	8192
(6)	4096	<4	32768	32768
	2048	16	4096	16384
(7)	—	4	4096	32768
	—	16	4096	8192
(8)	2048	32	32768	32768
	1024	32	8192	16384
(9)	2048	<4	<4	32768
	4096	<4	512	16384
(10)	4096	<4	256	131072
	512	<4	<4	2048
(11)	256	<4	>32768	2048
	4	4	4096	128
(12)	2048	<4	>32768	4096
	16	256	4096	256

Estos resultados muestran claramente la naturaleza variante - específica de las reacciones inmunes. Por ejemplo, las proteínas (1) y (2) incluyen secuencias de variantes 1 y 2 NMB1870, y los mejores resultados de SBA se ve contra de estas dos variantes. Del mismo modo, los mejores resultados se ven frente a las variantes 1 y 3 cuando se utilizan las proteínas (3) y (4). La buena actividad se ve utilizando NMB1870 a partir de las variantes 2 y 3, en

cualquier orden a partir del N -terminal a C -terminal, utilizando proteínas (5) a (8), con poca actividad contra la variante 1. La naturaleza de la variante específica de la respuesta NMB1870 es también evidente cuando se utiliza las proteínas híbridas, con alguna actividad anti - 2996 siendo proporcionada por la parte '936'.

5 Se utilizan los siguientes oligonucleótidos durante la construcción de las 12 proteínas:

Proteína	Cebador SEC ID N°S (Fwd & Rev)	Zonas de restricción
(1)	95 & 96	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(2)	97 & 98	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(3)	99 & 100	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(4)	101 & 102	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(5)	103 & 104	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(6)	105 & 106	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(7)	107 & 108	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(8)	109 & 110	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(9)	111 & 112	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(10)	113 & 114	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(11)	115 & 116	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(12)	117 & 118	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
NMB1870 _{M1239}	119 & 120	<i>Nde</i> I & <i>Bam</i> HI
NMB1870 ₂₉₉₆	121 & 122	<i>Nde</i> I & <i>Bam</i> HI

Proteína de tándem triple

Una proteína "de tándem triple", en la que n = 3, se construye a partir de cepas (1) MC58, (2), 2996 y (3) m1239. La proteína de triple tándem 757mer NH₂ - A - X₁ - L₁ - X₂ - L₂ - X₃ - L₃ - B - COOH tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 142:

10

Parte	A	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	X ₃	L ₃	B
Elemento	-	NBM1870 MC58	Enlazador rico en gly	NBM1870 2996	Enlazador rico en gly	NBM1870 m1239	-	-
SEC ID	-	80	144	81	144	84	-	-
Variante	-	1	-	2	-	3	-	-

Tanto X₂ y X₃ les falta el extremo N - Terminal hasta sus regiones poli - glicina (es decir; son secuencias ΔG).

15 **Títulos de SBA bactericida**

Se inmunizaron ratones con nueve proteínas diferentes y se testó la actividad bactericida de los sueros resultantes contra diversas cepas de meningococo, incluyendo las dos cepas que coinciden con las proteínas inmunizantes que se derivaron y las cepas que son diferentes de las proteínas inmunizantes. Las proteínas fueron nueve:

20

(A), (B) y (C) proteínas híbridas de 936 y NMB1870

(A) NMB1870_{MC58} = variante 1 [12]

(B) NMB1870₂₉₉₆ = variante 2, por ejemplo, SECs ID N°: 91 y & 92

25

(C) NMB1870_{M1239} = variante 3 por ejemplo, SECs ID N°: 91 y & 92

(D), (E) & (F) NMB1870 a partir de cepas individuales

(D) NMB1870_{MC58} = variante 1, por ejemplo, SEC ID N° 80

30

(E) NMB1870₂₉₉₆ = variante 2, por ejemplo SEC ID N° 81

(F) NMB1870_{M1239} = variante 3, por ejemplo SEC ID N° 84

(G), (H) & (I) NMB1870 proteínas en tándem

35

(G) NMB1870_{MC58} - NMB1870₂₉₉₆ = variantes 1 & 2 por ejemplo, SECs ID N° 79 & 82

(H) NMB1870₂₉₉₆ - NMB1870_{M1239} = variantes 2 & 3, por ejemplo SECs ID N° 87 & 88

(I) NMB1870_{MC58} - NMB1870_{M1239} = variantes 1 & 3 por ejemplo, SECs ID N° 83 & 85

40

Las respuestas bactericidas se midieron contra un máximo de 20 cepas que poseen la variante 1 del NMB1870, contra un máximo de 22 cepas con la variante 2 de NMB1870 y contra 5 cepas con la variante 3.

La eficacia bactericida del suero producido contra las proteínas de (A) a (C) coincidió con el genotipo de las cepas de prueba, por ejemplo, utilizando CFA como adyuvante para las inmunizaciones, los títulos de los SBA contra la cepa MC58 (variante 1) fueron: (A) 262144; (B) < 4; (C) < 4. Del mismo modo, cuando los sueros se testaron contra la cepa 961 – 5945 (variante 2) la SBA fue: (A) 256, (B) 32768; (C) 4096. Por último , frente a la cepa M1239 (variante 3) los títulos fueron: (A) < 4; (B) 512, (C) 32768.

Utilizando CFA o hidróxido de aluminio como adyuvante, la proteína (A) dio títulos SBA de ≥ 512 contra las siguientes cepas: M01 - 240185, M2197, LPN17592, M6190, (todo el ET37), MC58, BZ83, CU385, N44/89, 44/ 76, M2934, M4215 (todo el ET5); BZ133; M1390, ISS1026, ISS1126, ISS1102(lin.3; F6124 (s111) y M2937 otro). Estas cepas cubren los serotipos A, B, C y W135; no se testaron la cepas del serotipo Y.

Utilizando CFA o hidróxido de aluminio como adyuvante, la proteína (B) dio títulos de SBA ≥ 512 contra las cepas: 2996, 961-5945, 96217 (grupo A4); M01 - 240013, C11, NGH38, M3279, M4287, BZ232 (otro). Estas cepas cubren los serotipos B y C; se testaron las cepas W135 o Y; no se testó el serotipo A.

Utilizando CFA o hidróxido de aluminio como adyuvante, la proteína (C) dio títulos de SBA ≥ 512 contra las cepas: M01 - 0240364, NGP165 (ET37), M1239 (lin. 3); M01 - 240355, M3369 (otro). Estas cepas están en el serotipo B, se testaron las cepas W135 o Y; no se testó el serotipo A.

Los patrones de SBA visto con las proteínas (A) a (C), se observó también con proteínas (D) a (F). Contra la cepa MC58, se obtuvo suero utilizando la proteína (D) y el adyuvante de hidróxido de aluminio dio un título de SBA < 4 16384, mientras que se obtuvo suero utilizando la proteína (B) o (F) y el mismo adyuvante dio títulos de SBA < 4. Contra la cepa 961-5945, el suero de proteína (D) y (F) dio títulos inferiores a aquellos obtenidos utilizando (E). Contra la cepa M1239, los títulos de SBA fueron: (D) < 4; (E) 128; (F) 16384.

Con las proteínas en tándem, se amplió la eficacia de SBA. Los sueros obtenidos utilizando la proteína (G) fueron bactericidas contra la cepa MC58 y 961 - 5945, así como otras cepas que poseen la variante 1 o la variante 2 de NMB1870. Se incrementó el suero contra la proteína (H) que dio títulos bajos frente a las cepas que poseen variante 1 de NMB1870, pero los títulos altos contra otras cepas, por ejemplo, 16384 contra la cepa 961 - 5945 (variante 2) y 32768 contra la cepa M3369 (variante 3).

El suero obtenido por la inmunización con proteína adyuvante CFA (H) dio títulos de SBA ≥ 512 contra: LNP17094, 96217, 961-5945, 299 , 5/99 (grupo A4), C4678, M01 - 0240364, NGP165 (ET37), M1239 (lin. 3), M2552, BZ232, M3279, M4287, 1000, NGH38, C1 , M01 - 240013, M01 - 240355, M3369 (otro). Estas cepas cubren los serotipos B y C; la actividad contra los serotipos A, y no se testaron las cepas W135 o Y con proteína (H).

El suero obtenido por la inmunización con proteína adyuvante CFA (I) dio títulos de SBA ≥ 512 contra: M01 - 0240364, 14784, M6190, MC58, LPN17592, M2197 (ET37), 44 /76 (ET5); M1239, 1SS1102, 1SS1106, 1SS1026, 394 /98 (lin. 3), M2937 (otro). Estas cepas cubren los serotipos B, C y W135; y no se testó la actividad contra las cepas de los serotipos A o Y con proteínas (I).

Tras la inmunización con proteínas que contienen la variante 1 del NMB1870, se testaron los sueros contra un 20 cepas que tienen un NMB1870 en la variante 1 que dio títulos de SBA de la siguiente manera:

Proteína	(A)	(A)	(D)	(D)	(G)	(G)	(I)	(I)
Adyuvante	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
Nº de cepas testadas	18	20	20	20	13	13	11	11
SBA < 128	1	7	4	3	0	5	0	2
SBA 128 – 512	2	4	0	4	0	3	0	3
SBA > 512	15	9	16	13	13	5	11	6

Tras la inmunización con proteínas que contienen la variante 2 de NM1870, se testaron sueros contra 22 cepas que tienen un NMB1870 en la variante 2 que dio títulos de SBA de la siguiente manera:

Proteína	(B)	(B)	(E)	(G)	(G)	(H)	(H)	(I)	(I)
Adyuvante	CFA	Alum	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
Nº de cepas testadas	16	19	22	16	15	22	22	7	6
SBA < 128	6	14	13	6	10	7	8	3	5
SBA 128 – 512	0	2	7	3	3	1	6	0	1
SBA > 512	10	3	2	7	2	14	8	4	0

Tras la inmunización con proteínas que contienen la variante 3 de NMB1870, se testaron sueros contra 5 cepas que tienen un NMB1870 en la variante 3 que dio títulos de SBA de la siguiente manera:

Proteína	(C)	(C)	(F)	(G)	(G)	(H)	(H)	(I)	(I)
Adyuvante	CFA	Alum	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
Nº de cepas testadas	5	5	5	5	5	5	5	3	3
SBA < 128	0	1	1	1	1	0	0	1	1
SBA 128 – 512	0	0	0	0	2	0	0	0	1
SBA > 512	5	4	4	4	2	5	5	2	1

Conclusiones

5 Al principio, el NMB1870 no parece ser un antígeno útil para la amplia inmunización - sus niveles de expresión varían entre las cepas, hay una variabilidad de secuencia significativa, y no hay protección cruzada entre las diferentes variantes. Sin embargo, se ha demostrado que incluso las cepas que expresan niveles muy bajos de este antígeno son susceptibles a los sueros anti – NMB1870. Además, la diversidad de secuencias se limita a tres formas de variantes, tales que una amplia inmunidad puede lograrse sin necesidad de un gran número de antígenos. Además, parece que estas tres proteínas pueden ofrecer más inmunidad que el meningococo del serotipo B.

10 Las diferentes variantes de NMB1870 pueden expresarse juntas como proteínas de fusión con el fin de proporcionar cadenas de polipéptidos individuales, que son activos contra más de una variante.

15 El NMB1870 es inmunogénico durante la infección, es capaz de inducir anticuerpos bactericidas, y protege a las ratas infantas de la exposición a las bacterias .

Se puede encontrar en la referencia 197 más información experimental sobre el NMB1870.

20 Se entenderá que la invención sólo se ha descrito a modo de ejemplo y pueden hacerse modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO SECUENCIAL

SEC ID Nº:	Descripción
1 – 23	23 secuencias diferentes de NMB1870, longitud completa
24 – 45	22 secuencias diferentes de NMB1870, con cisteínas en extremo N - terminal
46	Secuencia de aminoácidos en el extremo N – terminal utilizada para la expresión
47 – 66	Cebadores en PCR
67 – 69	Secuencias parciales de la Figura 1
70 – 73 & 86	Motivos de secuencia para la retención u omisión de las proteínas de la invención
74 – 75	Caja Fur
76	“936” de MC58 con péptido líder procesado
77	Ejemplo de un híbrido 936 _{MC58} – ΔG – NMB1870 _{M1239}
78	Secuencia derivada de gonocóico utilizado para la expresión química
79, 82, 83, 85, 87, 88, 89, 90	Proteínas en tándem NMB1870
80, 81, 84	Secuencias truncadas NMB1870
91 – 94	Proteínas híbridas de “936” y NMB1870
95 – 122	Cebadores en PCR
123 – 141	Secuencias de longitud completa NMB1870
142	Secuencia de tándem triple NMB1870
143	Secuencia Haji NadA
144	Enlazador de glicina

25

REFERENCIAS

- [1] Jodar et al., (2002) Lancet 359(9316) : 1499 – 1508.
 [2] Tettelin et al., (2000) Science 287 : 1809 – 1815.
 30 [3] Pizza et al., (2000) Science 287 : 1816 – 1820.
 [4] Parkhill et al., (2000) Nature 404 : 502 – 506.
 [5] <http://dnal.chem.ou.edu/gono.html>
 [6] W099/24578.
 [7] W099/36544.
 35 [8] WO99/57280.
 [9] WO00/22430.
 [10] WO01/64920.
 [11] WOO 1/64922.
 [12] WO03/020756.

- [13] WO03/063766.
- [14] Achtman (1995) *Global epidemiology of meningococcal disease*. Páginas 159 – 175 de *Meningococcal disease* (ed. Cartwright). ISBN: 0 – 471 – 95259 – 1.
- [15] Caugant (1998) APMIS 106 : 505 – 525.
- 5 [16] Maiden et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 3140 – 3145.
- [17] Reilly & Smith (1999) Protein Expr Purif 17 : 401 – 409.
- [18] Covacci & Rappuoli (2000) J. Exp. Med. 19 : 587 – 592.
- [19] WO93/18150.
- [20] Covacci et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5791 – 5795.
- 10 [21] Tummuru et al., (1994) Infect. Immun. 61 : 1799 – 1809.
- [22] Marchetti et al., (1998) Vaccine 16 : 33 – 37.
- [23] Telford et al., (1994) J. Exp. Med. 179 : 1653 – 1658.
- [24] Evans et al., (1995) Gene 153 : 123 – 127.
- [25] WO96/01272 y WO96/01273, especialmente la SEC ID N° 6.
- 15 [26] WO97/25429.
- [27] WO98/04702.
- [28] Costantino et al., (1992) Vaccine 10 : 691 – 698.
- [29] Costantino et al., (1999) Vaccine 17 : 1251 – 1263.
- [30] Solicitud de patente internacional WO03/007985.
- 20 [31] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19 : 331 – 332.
- [32] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47 : 269 – 285, v.
- [33] Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65 : 187 – 207.
- [34] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19 : 1187 – 1188.
- [35] Iwarson (1995) APMIS 103 : 321 – 326.
- 25 [36] Gerlich et al., (1990) Vaccine 8 Suppl: S63 – 68 y 79 – 80.
- [37] Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0 – 7216 – 1946 – 0.
- [38] Del Giudice et al., (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19 : 1 – 70.
- [39] Gustafsson et al., (1996) N. Engl. J. Med. 334 : 349 – 355.
- [40] Rappuoli et al., (1991) TIBTECH 9 : 232 – 238.
- 30 [41] Hsu et al., (1999) Clin Liver Dis 3 : 901 – 915.
- [42] WO02/079243.
- [43] Solicitud de patente internacional WO02/02606.
- [44] Kalman et al., (1999) Nature Genetics 21 : 385 – 389.
- [45] Read et al., (2000) Nucleic Acids Res 28 : 1397 – 406.
- 35 [46] Shirai et al., (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3) : S524 – S527.
- [47] Solicitud de patente internacional WO99/27105.
- [48] Solicitud de patente internacional WO00/27994.
- [49] Solicitud de patente internacional WO00/37494.
- [50] Solicitud de patente internacional WO99/28475.
- 40 [51] Ross et al., (2001) Vaccine 19 : 4135 – 4142.
- [52] Sutler et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47 : 287 – 308.
- [53] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59 : 113 – 118, 125 – 126.
- [54] Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl : S2 – 6.
- [55] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16; 47(1) : 12, 19.
- 45 [56] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101 – 107.
- [57] Schuchat (1999) Lancet 353 (9146) : 51 – 6.
- [58] Solicitud de patente internacional WO02/34771.
- [59] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13 : 227 – 43, viii.
- [60] Ferretti et al., (2001) PNAS USA 98 : 4658 – 4663.
- 50 [61] Kuroda et al., (2001) Lancet 357 (9264) : 1225 – 1240; véanse también las páginas 1218 – 1219.
- [62] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39 : 85 – 100.
- [63] Demicheli et al., (1998) Vaccine 16 : 880 – 884.
- [64] Stepanov et al., (1996) J Biotechnol 44 : 155 – 160.
- [65] Ingram (2001) Trends Neurosci 24 : 305 – 307.
- 55 [66] Rosenberg (2001) Nature 411 : 380 – 384.
- [67] Moingeon (2001) Vaccine 19 : 1305 – 1326.
- [68] EP – A – 0372501
- [69] EP – A – 0378881
- [70] EP – A – 0427347
- 60 [71] WO93/17712
- [72] WO94/03208
- [73] WO98/58668
- [74] EP – A – 0471177
- [75] WO00/56360
- 65 [76] WO91/01146
- [77] WO00/61761

- [78] WO01/72337
 [79] Research Disclosure, 453077 (Enero 2002)
 [80] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2 : 47 – 49.
 [81] Ravenscroft et al., (1999) *Vaccine* 17 : 2802 – 2816.
 5 [82] Solicitud de patente internacional WO03/080678.
 [83] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69 : 292 – 296).
 [84] Frash (1990) p.123 – 145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
 [85] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55 : 1573 – 1579.
 [86] Kandil et al., (1997) *Glycoconj J* 14 : 13 – 17.
 10 [87] Berkin et al., (2002) *Chemistry* 8 : 4424 – 4433.
 [88] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2 : S28 – 36.
 [89] Buttery & Moxon (2000) *JR Coll Physicians Lond* 34 : 163 – 168.
 [90] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13 : 113 – 33, vii.
 [91] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47 : 563 – 567.
 15 [92] Patente Europea 0477508.
 [93] Patente US 5,306,492.
 [94] W098/42721.
 [95] Dick et al., en *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 1989, 10 : 48 – 114.
 [96] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
 20 [97] Kanra et al., (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42 : 421 – 427.
 [98] Ravenscroft et al., (2000) *Dev Biol (Basel)* 103 : 35 – 47.
 [99] WO97/00697.
 [100] WO02/00249.
 [101] Zielen et al., (2000) *Infect. Immun.* 68 : 1435 – 1440.
 25 [102] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4 : 609 – 630.
 [103] Tettelin et al., (2001) *Science* 293 : 498 – 506.
 [104] Hoskins et al., (2001) *J Bacteriol* 183 : 5709 – 5717.
 [105] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3 : 445 – 450
 [106] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19 : 2688 – 2691.
 30 [107] Masignani et al., (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2 : 895 – 905.
 [108] Mora et al., (2003) *Drug Discov Today* 8 : 459 – 464.
 [109] Wizemann et al., (2001) *Infect Immun* 69 : 1593 – 1598.
 [110] Rigden et al., (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38 : 143 – 168.
 [112] Ramsay et al., (2001) *Lancet* 357 (9251) : 195 – 196.
 35 [113] Anderson (1983) *Infect Immun* 39 (I) : 233 – 238.
 [114] Anderson et al., (1985) *J Clin Invest* 76 (I) : 52 – 59.
 [115] Falugi et al., (2001) *Eur J Immunol* 31 : 3816 – 3824.
 [116] EP – A – 0594610.
 [117] WO02/091998.
 40 [118] WO99/42130
 [119] WO96/40242
 [120] Lees et al., (1996) *Vaccine* 14 : 190 – 198.
 [121] WO95/08348.
 [122] Patente US 4,882,317
 45 [123] Patente US 4,695,624
 [124] Porro et al., (1985) *Mol Immunol* 22 : 907 – 919.s
 [125] EP – A – 0208375
 [126] WO00/10599
 [127] Gever et al., *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171 – 288 (1979).
 50 [128] Patente US 4,057,685.
 [129] Patentes US 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
 [130] Patente US 4,459,286.
 [131] Patente US 4,965,338
 [132] Patente US 4,663,160.
 55 [133] Patente US 4,761,283
 [134] Patente US 4,356,170
 [135] Lei et al., (2000) *Dev Biol (Basel)* 103 : 259 – 264.
 [136] WO00/38711; Patente US 6,146,902.
 [137] WO02/09643.
 60 [138] Katial et al., (2002) *Infect Immun* 70 : 702 – 707.
 [139] WO01/52885.
 [140] Patente Europea 0301992.
 [141] Bjune et al., (1991) *Lancet* 338 (8775) : 1093 – 1096.
 [142] Fukasawa et al., (1999) *Vaccine* 17 : 2951 – 2958.
 65 [143] WO02/09746.
 [144] Rosenqvist et al., (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92 : 323 – 333.

- [145] WO01/09350.
 [146] Patente Europea 0449958.
 [147] EP – A – 0996712.
 [148] EP – A – 0680512.
 5 [149] WO02/062378.
 [150] W099/59625.
 [151] Patente US 6,180,111.
 [152] WO01/34642.
 [153] WO03/051379.
 10 [154] Patente US 6,558,677
 [155] PCT/IB03/04293.
 [156] WO02/062380.
 [157] WO00/25811.
 [158] Peeters et al., (1996) *Vaccine* 14 : 1008 – 1015.
 15 [159] Vermont et al., (2003) *Infect Immun* 71 : 1650 – 1655.
 [160] WO01/30390.
 [161] Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [162] WO03/009869.
 [163] *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0 – 306
 20 – 44867 – X).
 [164] WO90/14837.
 [165] WO02/26212.
 [166] WO98/33487.
 [167] WO00/07621.
 25 [168] WO99/27960.
 [169] WO98/57659.
 [170] Solicitudes de patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231.
 [171] Krieg (2000) *Vaccine* 19 : 618 – 622; Krieg (2001) *Curr opin Mol Ther* 2001 3 : 15 – 24; WO96/02555,
 WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581, etc.
 30 [172] W099/52549.
 [173] WO01/21207.
 [174] WO01/21152.
 [175] WO00/62800.
 [176] WO00/23105.
 35 [177] WO99/11241.
 [178] de Lorenzo et al., (1987) *J. Bacteriol.* 169 : 2624 – 2630.
 [179] Nakai & Kanehisa (1991) *Proteins* 11 : 95 – 110.
 [180] Yamaguchi et al., (1988) *Cell* 53 : 423 – 432.
 [181] <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>
 40 [182] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
 [183] Strutzberg et al., (1995) *Infect. Immun.* 63 : 3846 – 3850.
 [184] Legrain et al., (1993) *Gene* 130 : 73 – 80.
 [185] Loosmore et al., (1996) *Mol Microbiol* 19 : 575 – 586.
 [186] Myers et al., (1998) *Infect. Immun.* 66 : 4183 – 4192.
 45 [187] Schlegel et al., (2002) *J. Bacteriol.* 184 : 3069 – 3077.
 [188] Turner et al., (2002) *Infect. Immun.* 70 : 4447 – 4461.
 [189] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/micr.html>
 [190] Voulhoux et al., *Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference*. NIPH, Oslo, página 31.
 [191] Comanducci et al., (2002) *J. Exp. Med.* 195 : 1445 – 1454.
 50 [192] WO03/010194.
 [193] Jennings et al., (2002) *Eur. J. Biochem.* 269 : 3722 – 3731.
 [194] Granoff et al., (1998) *J. Immunol.* 160 : 5028 – 5036.
 [195] Grifantini et al., (2002) *Nat. Biotechnol.* 20 : 914 – 921.
 [196] Peeters et al., (1999) *Vaccine* 17: 2702 – 2712.
 55 [197] Masignani et al., (2003) *J Exp Med* 197 : 789 – 799.

60

65

LISTADO SECUENCIAL

5 *SEC ID N° 1 - cepa M58 [WO / 57280]*
 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
 AKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

10 *SEC ID N° 2 - cepa gb185*
 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGKLTITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

15 *SEC ID N° 3 - cepa m4030*
 MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

20 *SEC ID N° 4 - cepa iss1001*
 MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKDMATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

25 *SEC ID N° 5 - cepa lnp592*
 MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDK
 VSRFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLY
 TIDFAVQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

30 *SEC ID N° 6 - cepa f6124*
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGKLYTTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

35 *SEC ID N° 7 - cepa m198171*
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGKLYTTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

40 *SEC ID N° 8 - cepa m2197*
 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

45 *SEC ID N° 9 - cepa m2937*
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLRSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDLEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPREGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
 AKQYGGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

50 *SEC ID N° 10 - cepa 961 - 5945*
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPKIDS LINQRS FLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA
 KQGHGKIEHLKTEPQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKI GEKVHEIGIAGKQ

55 *SEC ID N° 11 - cepa gb083*
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPKIDS LINQRS FLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA
 KQGHGKIEHLKTEPQNVELASAELKADEKSHAVILGDTTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKI REKVHEIGIAGKQ

60
 65

SEC ID N° 12 - cepa 860800

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

5

SEC ID N° 13 - cepa 95n477

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

10

SEC ID N° 14 - cepa m2671

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

15

SEC ID N° 15 - cepa 1000

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

20

SEC ID N° 16 - cepa m3279

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

25

SEC ID N° 17 - cepa 193 - 4286

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

30

SEC ID N° 18 - cepa ml 239

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLN
NDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLR
HYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

35

SEC ID N° 19 - cepa 16889

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLN
NDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKL
TYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEISIAGKQ

40

SEC ID N° 20 - cepa gb355

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLN
NDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKL
TYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

45

SEC ID N° 21 - cepa m3813

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGIAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLN
KISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLT
TIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

50

SEC ID N° 22 - cepa ngp165

MNRTTFCCSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGGKDNSLNTGKLN
NDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLR
HYTIDFTNKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

55

SEC ID N° 23 - cepa fa1090

MNRTTFCCSLTAGPDSRLQRRGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEASIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGGKDNSLNTGKLN
KISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALRIEINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDADGKLT
TIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYRLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIADKQ

60

65

SEC ID N° 24 - cepa MC58

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVD
 LAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVRTVNGIRHIGLAAKQ

5

SEC ID N° 25 - cepa gb185

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGKLTITLESGEF
 QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVE
 LATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQEKGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

10

SEC ID N° 26 - cepa m4030

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVE
 LATAYIKPDEKRRHAVISGSVLYNQEKGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

15

SEC ID N° 27 - cepa iss1001

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSGKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVE
 LATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQEKGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

20

SEC ID N° 28 - cepa lnp17592

CSSGGGGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL
 ESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAVQGHGKIEHLKSP
 ELNVDLAAAYIKPDKRRHAVISGSVLYNQEKGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

25

SEC ID N° 29 - cepa f6124

CSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVD
 LAASDIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

30

SEC ID N° 30 - cepa m198172

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVD
 LAASDIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

35

SEC ID N° 31 - cepa m2197

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVD
 LAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVRTVNGIRHIGLAAKQ

40

SEC ID N° 32 - cepa m2937

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLRSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QVYKQSHSALTALQTEQEQDLEHSGKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPREGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGYGKIEHLKSPELNVD
 LAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQEKGKSYSLGIFGGEAQEVAGSAEVRTANGIHHIGLAAKQ

45

SEC ID N° 33 - cepa 961 - 5945

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPQNVEL
 AAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

50

SEC ID N° 34 - cepa gb013

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPQNVEL
 ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

55

SEC ID N° 35 - cepa 860800

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL
 ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

60

65

SEC ID N° 36 - cepa 95n477

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

5

SEC ID N° 37 - cepa m2176

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

10

SEC ID N° 38 - cepa 1000

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEF
QIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

15

SEC ID N° 39 - cepa m3279

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEF
QIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

20

SEC ID N° 40 - cepa 193 - 4286

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEF
QIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

25

SEC ID N° 41 - cepa m1239

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQT
ITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLK
TLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVGIKEKVHEIGIAGKQ

30

SEC ID N° 42 - cepa 16889

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQT
ITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLK
TPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVGIKEKVHEISIAAGKQ

35

SEC ID N° 43 - cepa gb355

CSSGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQT
ITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLK
TPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVGIKEKVHEIGIAGKQ

40

SEC ID N° 44 - cepa 3813

CSSGGGSGGIAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTIT
LASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP
EQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVGIKEKVHEIGIAGKQ

45

SEC ID N° 45 - cepa ngp165

CSSGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQT
ITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTNKQGYGRIEHLK
TPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVGIKEKVHEIGIAGKQ

50

SEC ID N° 46 - cepa secuencia de extremo N - terminal para expresión

GPDSRLQRRG

55

SEC ID N° 47 - cebador en PCR

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

60

SEC ID N° 48 - cebador en PCR

CCCGCTCGAGTTGCTTGGCGGCAAGGC

SEC ID N° 49 - cebador en PCR

CGCGGATCCCATATGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

65

SEC ID N° 50 - cebador en PCR

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGGCATGCC

SEC ID N° 51 - cebador en PCR

CGCGGATCCCATATGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGGAGGGGTGGTGTCCG

SEC ID N° 52 - cebador en PCR

GCCCAAGCTTCTGTTTGC CGGCATGCC

SEC ID N° 53 - cebador en PCR

CGCGGATCCCATATGAATCGAAGTGCCTTCTGTGCC

SEC ID N° 54 - cebador en PCR

CCCGCTCGAGTTATTGCTTGGCGGCAAGGC

SEC ID N° 55 - cebador en PCR

GACCTGCCTCATTGATG

SEC ID N° 56 - cebador en PCR

CGGTAATTATCGTGTTCGGACGGC

SEC ID N° 57 - cebador en PCR

CAAATCGAAGTGGACGGGCAG

SEC ID N° 58 - cebador en PCR

TGTTGATTTTGCCGTTCCCTG

SEC ID N° 59 - cebador en PCR

GCTCTAGACCAGCCAGGCGCATAC

SEC ID N° 60 - cebador en PCR

TCCCCCGGGACGGCATTGTTTACAGG

SEC ID N° 61 - cebador en PCR

TCCCCCGGGCGCCAAGCAATAACCATTG

SEC ID N° 62 - cebador en PCR

CCCGCTCGAGCAGCGTATCGAACCATGC

SEC ID N° 63 - cebador en PCR

GCTCTAGATTCTTTCCAAGAACTCTC

SEC ID N° 64 - cebador en PCR

TCCCCCGGGCCCGTATCATCCACCAC

SEC ID N° 65 - cebador en PCR

TCCCCCGGGATCCACGCAATACCCC

SEC ID N° 66 - cebador en PCR

CCCGCTCGAGATATAAGTGAAGACGGA

SEC ID N° 67 - Secuencia de la Figura 1

LNQIVK

SEC ID N° 68 - Secuencia de la Figura 1

VNRTAFCCLSLTTALILTAC

SEC ID N° 69 - Secuencia de la Figura 1

**AATTGAACCAAATCGTCAAATAACAGGTTGCCTGTAACAAAATGCCGCTGAACCGCCGTTCCGGACGACATTTGATTTTTGCTTCTTTGACCTGC
CTCATTGATGCGGTATGCAAAAAAGATACCATAACCAAATGTTATATATTATCTATTCTGCGTATGACTAGGAGTAAACCTGTGAATCGAACT
GCCTTCTGCTGCCCTTCTCTGACCACTGCCCTGATTCTGACCGCCTGC**

SEC ID N° 70 - Secuencia que puede omitirse

TRSKP

SEC ID N° 71 - Secuencia que puede omitirse

TRSKPV

SEC ID N° 72 - Secuencia que puede omitirse

PSEPPFG

SEC ID N° 73 - Secuencia que puede omitirse

GGGG

SEC ID N° 74 - Caja fur supuesta en MenB

CATAACCAAATGTTTATA

SEC ID N° 75 - Caja fur consenso de E. coli

GATAATGATAATCATTATC

SEC ID N° 76 - "936" de MC58 con péptido líder procesado

**VSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDNNMALRIETTARSYLQRNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYI
TVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQR**

SEC ID N° 77 - Ejemplo de proteína híbrida

**MVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDNNMALRIETTARSYLQRNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYI
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGVAAIDIG
TGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSAQGAEKTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQITTLASGEFQIYKQNHSAV
VALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAAEKKADEK
SHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**

SEC ID N° 78 - Secuencia para expresión

GSGPDSRLQQR

SEC ID N° 79 - NMB1870 en tandem (MC58 & 2996)

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRLQQRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSL
TLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFL
VSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALF
GDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**

SEC ID N° 80 - NBM1870MC58 con borrado en el extremo N - terminal ΔG

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTVNGIRHIGLAAKQ**

SEC ID N° 81 NBM18702996 con borrado en el extremo N - terminal ΔG

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDH
SAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKA
DEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**

SEC ID N° 82 - NMB1870 en tandem (MC58 & 2996)

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTVNGIRHIGLAAKQSGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVR
KNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGG
HTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQE
IAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**

SEC ID N° 83 - NBM1870 en tadem (MC58 - M1229)

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRLQQRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
TLEDSIPQNGTTLTSAQGAEKTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQITTLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQR**

SFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 84 - NBM1870MC58 con borrado en el extremo N - terminal ΔG

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 85 - NBM1870 en tandem (MC58 & M1239)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRTATYRGTAFGSSDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 86 - Secuencia para expresión

GPDSRDLQRR

SEC ID N° 87 - NBM1870 (2996 & M1239)

GPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 88 - NBM1870 en tandem (2996 & M1239)

GPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 89 - NBM1870 en tandem (M1239 & 2996)

GPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 90 - NBM1870 en tandem (M1239 & 2996)

GPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 91 - Híbrido de la proteína " 936" y NBM18702996

CVSAVIGSAVGAASAVDRRTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNQTKGYTPQISVVGYNRHLALLLQVATEGEKQFVQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYVMGILTPPEQAQITQKVSTTVGVQKVIITLYQNYVQRGSGPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 92 - Híbrido de proteína "936" y NMB18702996

CVSAVIGSAAVGA~~S~~AVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYL~~R~~QNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLGGVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVYNY
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGI SPATQARVKIVTYGNVTVVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGVAADIG
AGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVR~~K~~NEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS~~A~~VVAL
QIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP~~E~~QNV~~L~~AAAAELKADEKSHA
VILGDTRYGSEEKGT~~Y~~HLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

5

SEC ID N° 92 - Híbrido de proteína "936" y NMB1870M1239

CVSAVIGSAAVGA~~S~~AVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYL~~R~~QNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLGGVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVYNY
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGI SPATQARVKIVTYGNVTVVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGPDS~~R~~LQOR
RVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISR~~F~~DFVQKIEVDGQTITLASGEFQIY
KQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPN~~G~~RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLK~~T~~LEQNV~~L~~AAAA
ELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT~~Y~~HLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

10

15

SEC ID N° 93 - Híbrido de proteína "936" y NMB1870M1239

CVSAVIGSAAVGA~~S~~AVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYL~~R~~QNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLGGVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVYNY
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGI SPATQARVKIVTYGNVTVVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGVAADIG
TGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISR~~F~~DFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAV
VALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPN~~G~~RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLK~~T~~LEQNV~~L~~AAAAELKADEK
SHAVILGDTRYGSEEKGT~~Y~~HLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

20

25

SEC ID N° 94 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 95 - cebador de oligonucleótidos

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

30

SEC ID N° 96 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTCC

SEC ID N° 97 - cebador de oligonucleótidos

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

35

SEC ID N° 98 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 99 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

40

SEC ID N° 100 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTCC

SEC ID N° 101 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

45

SEC ID N° 102 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

50

SEC ID N° 103 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 104 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTCC

55

SEC ID N° 105 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 106 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

60

SEC ID N° 107 - cebador de oligonucleótidos

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

65

SEC ID N° 109 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

5

SEC ID N° 110 - cebador de oligonucleótidos

CCCCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 111 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

10

SEC ID N° 112 - cebador de oligonucleótidos

CCCCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 113 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

15

SEC ID N° 114 - cebador de oligonucleótidos

CCCCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 115 - cebador de oligonucleótidos

20

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 116 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

25

SEC ID N° 117 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

SEC ID N° 118 - cebador de oligonucleótidos

30

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 119 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 120 - cebador de oligonucleótidos

35

CGCGGATCCCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 121 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 122 - cebador de oligonucleótidos

40

CGCGGATCCCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 123 - cepa FN131217

45

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLP EGGRATYRGTAFGSDDASGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSLNVDLAASDIKPKKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

SEC ID N° 124 - cepa ES14933

50

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSALTALQTEQEQDPEHSGKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

SEC ID N° 125 - cepa GB0993

55

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPENVELAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIQHIGLAAKQ

SEC ID N° 126 - cepa M6190

60

MNRTTFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVNGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSRKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGD SATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGYGKIEHLKSPENVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

65

SEC ID N° 127 - cepa F19324

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

5

SEC ID N° 128 - cepa ISS1113

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

10

SEC ID N° 129 - cepa gb0345

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

15

SEC ID N° 130 - cepa M0445

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIQHIGLAAKQ

20

SEC ID N° 131 - cepa MK82

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPVDKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

25

SEC ID N° 132 - cepa 8047

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

30

SEC ID N° 133 - cepa C4678

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

35

SEC ID N° 134 - cepa ISS1133

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

40

SEC ID N° 135 - cepa GN6 / 88

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

45

SEC ID N° 136 - cepa M0579

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

50

SEC ID N° 137 - cepa F16325

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

55

SEC ID N° 138 - cepa gb988

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKVSRFD
NOKISRFDFVQKIEVDGQTTITLASEGFQYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPGDCAEYHGKAFSSDDPNGLR
HYTIDFTNKQGYGRIEHLKTPELNVDLASEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

60

65

SEC ID N° 139 - cepa 2201731

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA
AKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKSYSLSGIFGGKA

SEC ID N° 140 - cepa gb101

MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLNK
NDKISRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGK
LYTTIDFAAQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEEKSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVEANGIRHIGLAAKQ

SEC ID N° 141 - cepa mge31

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGTGLAYALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR
FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDF
TKKQGYGRIEHLKTPQENVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 142 - Tandem NMB1870 triple (MC58, 2996 y m1239)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTAFQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEEKSYSLSGIFGGKAQEVAGSAEVTNNGIRHIGLAAKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVR
KNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGE
HTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAAQGHGKIEHLKTPQENVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEI
AGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLNKDKI
SRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSI
DFTKKQGYGRIEHLKTPQENVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 143 - cepas NadA de Haji

MKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVNTLTKT
VNENKQNVDAKVAEAEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFEETKTNIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDET
NTKADEAVKTANEAKQTAETKQNVDAKVAEAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKONIACKANSADVYTREESDSKFVRI
DGLNATTEKLDTRLASAEXSITEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESASAVAIGTGFRFTENFAAKG
VAVGTSSGSSAAYHVGVNYEW

SEC ID N° 144 - enlazador de glicina

GSGGGG

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica de dos proteínas que comprende (a) una sal de aluminio adyuvante; (b) una primera proteína que comprende una secuencia aminoácida que tiene, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a SEC ID N° 24 y (c) una segunda proteína, que comprende una secuencia aminoácida que tiene, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a SEC ID N° 33; en la que la proteína (b) tiene menos del 70 % de identidad de secuencia respecto a la proteína (c).
2. La composición según la reivindicación 1, en la que la composición puede obtener una respuesta anticuerpo bactericida contra cepas de *N. meningitidis* en, al menos, 2 líneas hipervirulentas ET – 37, ET – 5, grupo A4, línea 3, subtipo I, subtipo III y subtipo IV – 1.
3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la primera proteína tiene, al menos, un 88 % de identidad respecto a la SEC ID N° 24.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la segunda proteína tiene, al menos, un 88 % de identidad respecto a la SEC ID N° 33.
5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha primera y / o segunda proteína(s) es / son proteínas meningocócicas.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que una o más de las proteínas es una lipoproteína.
7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que, al menos, una de las proteínas no incluye la secuencia aminoácida TSKP (SEC ID N° 70) o TRSKPV (SEC ID N° 71) en los 10 aminoácidos de sus extremos N – Terminal.
8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que, al menos, una de las proteínas no incluye la secuencia aminoácida PSEPPFG (SEC ID N° 72) en los 10 aminoácidos de sus extremos N – Terminal.
9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que, al menos, una de las proteínas incluye la secuencia aminoácida GGGG (SEC ID N° 73).
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que, al menos, una de las proteínas se utiliza en forma de proteína de fusión.
11. La composición según la reivindicación 10, en la que la proteína de fusión incluye la SEC ID N° 46 y / o la secuencia de lipoproteína líder P4 de *H. influenzae*.
12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una o más proteínas que contienen una secuencia aminoácida seleccionada de SECs ID N° 1 a 45 y 77.
13. Una composición que contiene una proteína híbrida con fórmula $NH_2 - A - [- X - L -]_n - B - COOH$, en la que:
- (I) n es 2 o más; L es una secuencia aminoácida de unión opcional; A es una secuencia aminoácida N – Terminal opcional, B es una secuencia aminoácida C – Terminal opcional; y las partes X incluyen: (a) una primera proteína que contiene una secuencia aminoácida con, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a la SEC ID N° 24; y (b) una segunda proteína que contiene una secuencia aminoácida con, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a la SEC ID N° 33; y en la que la proteína (a) tiene menos del 70 % de identidad de secuencia respecto a la proteína (b); *presentado que* la proteína híbrida no tiene ninguna de las

```

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKND
KVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQGLADALTA
PLDHRDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSRLFDFIRQIEVDG
QLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSPGKAE
YHGKAFSSDDPNGLRHLYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYG
GEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHETHHHHHH

```

siguientes secuencias:

o

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKND
 KVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIA
 GEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFSGDDAGGKLTYTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
 PDGKRHAVISGSLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQMTSRKPVN
 RTAFCCSLTAALILITACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLK
 LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVALQI
 EKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTKKQ
 GYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATV
 KIREKVHEIGIAGKQHSHHHHH ;

5
 10 (II) n es 2 o más; L es una secuencia aminoácida de unión; A es una secuencia aminoácida N – Terminal, B es una secuencia aminoácida C – Terminal opcional; y las partes X incluyen: (a) una primera proteína que contiene una secuencia aminoácida con, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a la SEC ID N° 24; y (b) una segunda proteína que contiene una secuencia aminoácida con, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a la SEC ID N° 33; y en la que la proteína (a) tiene menos del 70 % de identidad de secuencia respecto a la proteína (b);
 15

(III) n es 2 o más; L es una secuencia aminoácida de unión opcional; A es una secuencia aminoácida N – Terminal opcional, B está ausente; y las partes X incluyen: (a) una primera proteína que contiene una secuencia aminoácida con, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a la SEC ID N° 24; y (b) una segunda proteína que contiene una secuencia aminoácida con, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a la SEC ID N° 33; y en la que la proteína (a) tiene menos del 70 % de identidad de secuencia respecto a la proteína (b);
 20

o

25 (IV) n es 3 o más; L es una secuencia aminoácida de unión opcional; A es una secuencia aminoácida N – Terminal opcional, B es una secuencia aminoácida C – Terminal opcional; y las partes X incluyen: (a) una primera proteína que contiene una secuencia aminoácida con, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a la SEC ID N° 24; y (b) una segunda proteína que contiene una secuencia aminoácida con, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a la SEC ID N° 33; y en la que la proteína (a) tiene menos del 70 % de identidad de secuencia respecto a la proteína (b).
 30

14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno de Neisserial diferente a la proteína NMB1870.

35 15. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo una vesícula preparada a partir de *N. meningitidis*.

16. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno sacárido de los serotipo A, C, W135 y / o Y de *N. meningitidis*.
 40

17. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno sacárido de los serotipo A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.

18. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B.
 45

19. La composición según las reivindicaciones 16 a 18, en la que el / los antígeno(s) sacárido(s) se conjuga(n) a una o más proteínas portadoras.

50 20. La composición según las reivindicaciones 16 a 19, en la que el / los antígeno(s) sacárido(s) son oligosacáridos.

21. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae*.
 55

22. La composición según las reivindicaciones 16 a 19, en la que: (a) el antígeno sacárido del serotipo A es un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo del sacárido nativo ha sido reemplazado por un grupo bloqueantes; o (b) un antígeno sacárido del serotipo A contiene n unidades monosacáridas, en el que n es un número entero entre 1 y 100 y, al menos, el 50 % de las unidades monosacáridas no tiene grupos – OH en las posiciones 3 y 4; o (c) el sacárido del serotipo A incluye unidades monosacáridas, en las que, al menos, 1 de las unidades monosacáridas no tiene grupo – OH en las posiciones 3 y 4.
 60

23. La composición según la reivindicación 19, en la que la proteína portadora es una anatoxina diftérica, una anatoxina tetánica, CRM₁₉₇, una proteína de la membrana externa de *N. meningitidis*, proteína D de *H. influenzae*, o proteína de superficie pneumocócica PspA.
 65

24. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, incluyendo: (i) un antígeno sacárido de cada serotipo A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*; (ii) un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B; y (iii) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.
- 5 25. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es estéril.
26. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es tamponada a un pH de entre 6 y 8.
- 10 27. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es isotónica respecto a los humanos.
28. La composición según la reivindicación 13, incluyendo un adyuvante.
- 15 29. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un hidróxido de aluminio adyuvante o un fosfato de aluminio adyuvante.
30. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición no incluye vesículas de la membrana externa.
- 20 31. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su utilización como un medicamento.
32. La utilización de una primera proteína y de una segunda proteína como se define en la reivindicación 1, y una sal de aluminio adyuvante, en la fabricación de un medicamento para prevenir la infección por Neisserial en un mamífero.
- 25 33. La utilización según la reivindicación 32, en la que los antígenos se expresan de manera recombinante en un huésped heterólogo y, después, se purifican.
- 30 34. La composición según la reivindicación 31, o la utilización según las reivindicaciones 32 o 33, en la que el medicamento es administrado a un paciente por inyección parenteral.
- 35 35. La composición o la utilización según la reivindicación 34, en la que el medicamento se administra intramuscularmente a una dosis de 0,5 ml.
36. Un ácido nucleico que codifica una proteína híbrida como se defina en la reivindicación 13.

40

45

50

55

60

65

Figura 2

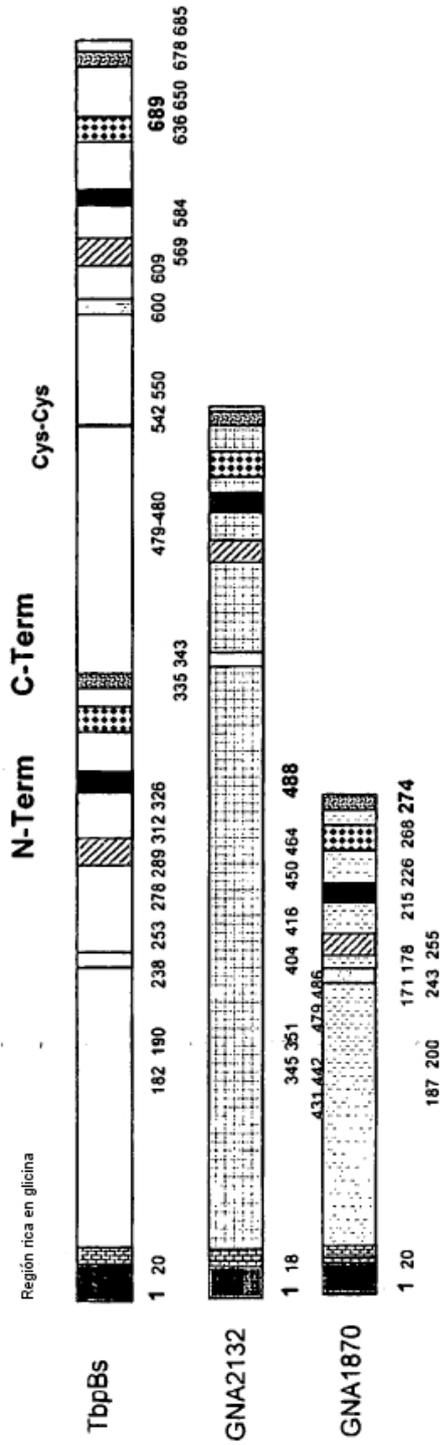


FIGURA 3

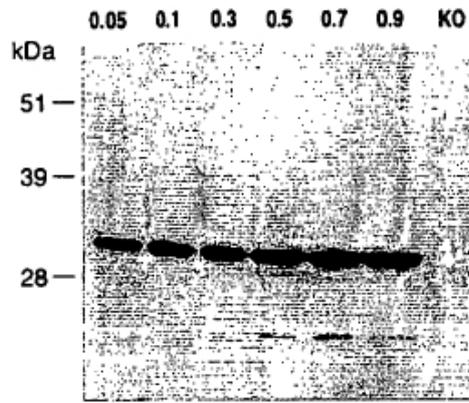


FIGURA 4

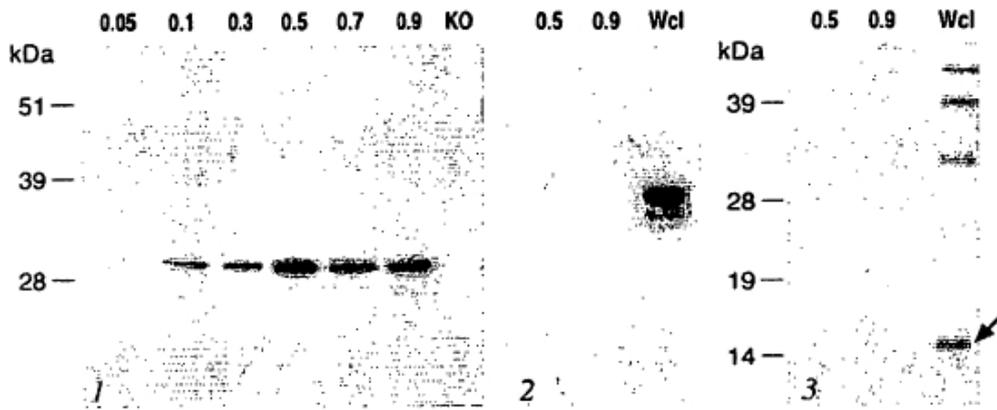


FIGURA 5

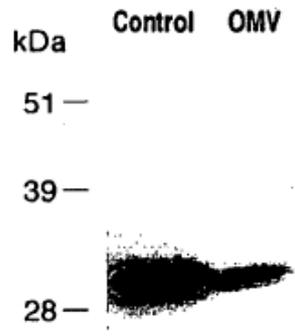


FIGURA 6

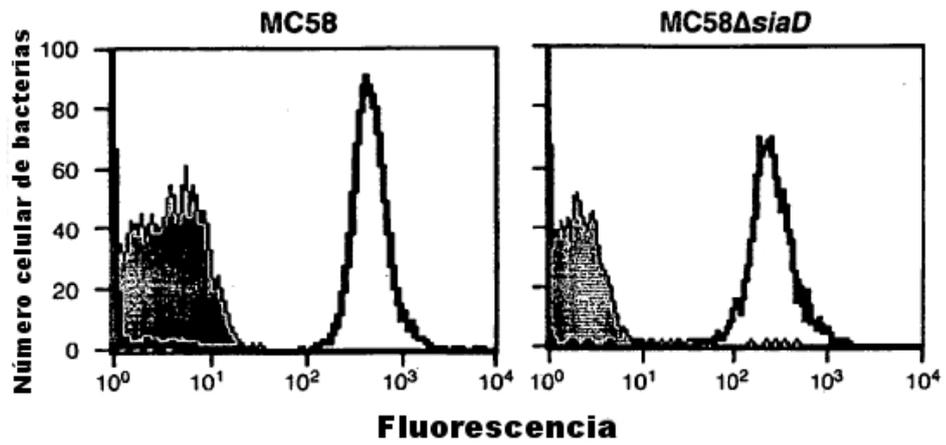


FIGURA 7

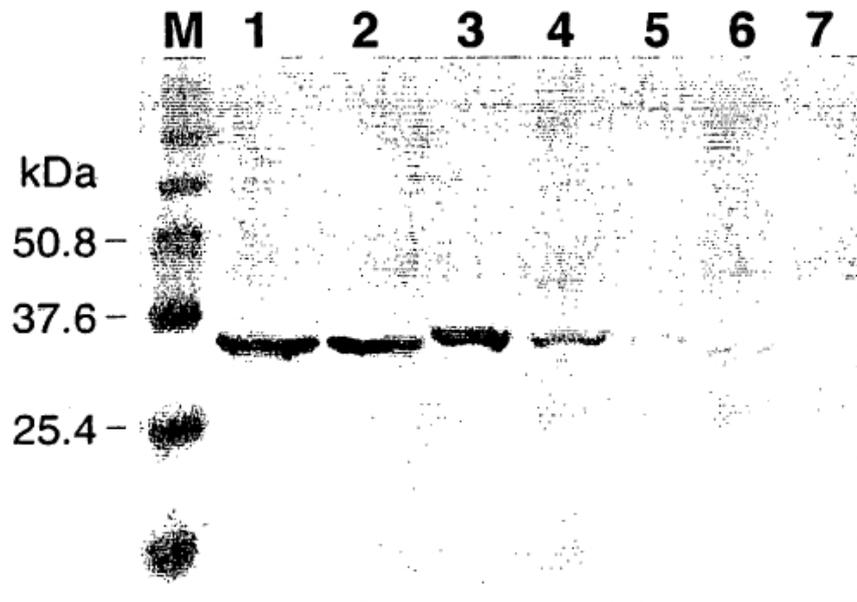


FIGURA 8

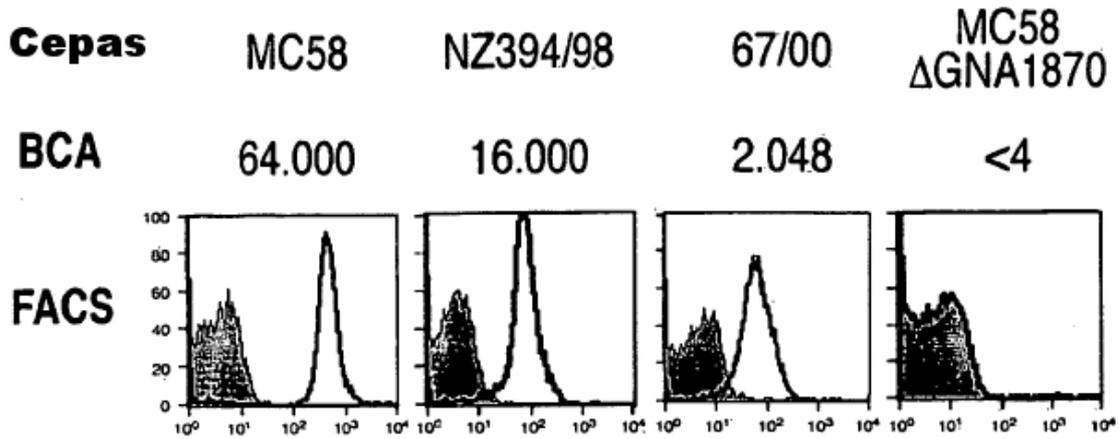


FIGURA 9

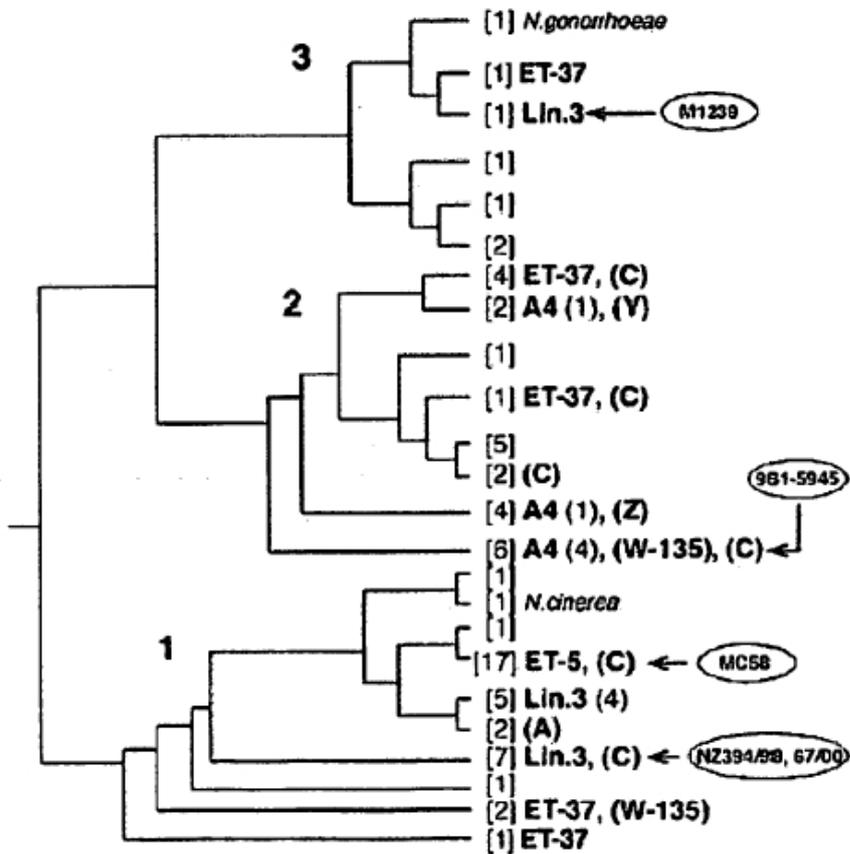


FIGURA 10

1

tipo 1 -19: VNR¹TAFCCLSL²TALIL³TACS.....SGGGGVAADIGAGLADALTAPLDH: 26

tipo 2 -19: VNR¹TAFCCLSL²TALIL³TACS.....SGGGGVAADIGAGLADALTAPLDH: 26

tipo 3 -19: VNR¹TAFCCLSL²TALIL³TACSSGGGSSGGGVAADIG⁴TGLADALTAPLDH: 31

tipo 1 27: KDKGLQSL¹TL²DQSVR³KNEK⁴LKLA⁵AQGA⁶EKT⁷YNGD...SLNTGK⁸LKND⁹KV: 73

tipo 2 27: KDKSLQSL¹TL²DQSVR³KNEK⁴LKLA⁵AQGA⁶EKT⁷YNGD...SLNTGK⁸LKND⁹KV: 73

tipo 3 32: KDKGLKSL¹TL²ED³SI⁴PONG⁵TL⁶LSA⁷QGA⁸EKT⁹PKAG¹⁰DKD¹¹NSLNTGK¹²LKND¹³KV: 81

tipo 1 74: SRFD¹FIR²QIEV³DG⁴QLIT⁵LES⁶GE⁷FQ⁸YK⁹QSH¹⁰SALT¹¹AF¹²QTE¹³QI¹⁴QD¹⁵SE¹⁶HS¹⁷GK¹⁸M: 123

tipo 2 74: SRFD¹FIR²QIEV³DG⁴QLIT⁵LES⁶GE⁷FQ⁸YK⁹QD¹⁰HS¹¹AV¹²VAL¹³QIE¹⁴KIN¹⁵NP¹⁶DK¹⁷IDS¹⁸L: 123

tipo 3 82: SRFD¹FV²QK³IEV⁴DG⁵QI⁶TIT⁷LAS⁸GE⁹FQ¹⁰YK¹¹QD¹²HS¹³AV¹⁴VAL¹⁵QIE¹⁶KIN¹⁷NP¹⁸DK¹⁹IDS²⁰L: 131

tipo 1 124: VAK¹RO²FRI³GD⁴IAGE⁵HT⁶SFD⁷KL⁸PE⁹CCR¹⁰AT¹¹YR¹²CT¹³AF¹⁴GSD¹⁵DAG¹⁶GK¹⁷LY¹⁸TT¹⁹ID²⁰FA: 173

tipo 2 124: IN¹QRS²FLV³SGL⁴GG⁵EHT⁶AF⁷NQ⁸LP.D⁹CK¹⁰A¹¹E¹²Y¹³H¹⁴G¹⁵K¹⁶AF¹⁷SS¹⁸D¹⁹DAG²⁰GK²¹LY²²TT²³ID²⁴FA: 172

tipo 3 132: IN¹QRS²FLV³SGL⁴GG⁵EHT⁶AF⁷NQ⁸LP.G⁹G¹⁰K¹¹A¹²E¹³Y¹⁴H¹⁵G¹⁶K¹⁷AF¹⁸SS¹⁹DD²⁰P²¹NG²²R²³L²⁴HY²⁵S²⁶ID²⁷FT: 180

tipo 1 174: AK¹Q²GN³GK⁴IE⁵HL⁶KS⁷PE⁸L⁹N¹⁰V¹¹D¹²LAA¹³AD¹⁴DK¹⁵PD¹⁶G¹⁷K¹⁸R¹⁹H²⁰AV²¹IS²²GS²³V²⁴LY²⁵NQ²⁶AE²⁷K²⁸GS²⁹YS: 223

tipo 2 173: AK¹Q²GH³GK⁴IE⁵HL⁶KT⁷PE⁸Q⁹N¹⁰VELAA¹¹AE¹²LKA¹³DE¹⁴K¹⁵SH¹⁶AV¹⁷IL¹⁸GD¹⁹TRY²⁰G²¹SEE²²K²³G²⁴TY²⁵H: 222

tipo 3 181: KK¹Q²Y³GR⁴IE⁵HL⁶KT⁷LE⁸Q⁹N¹⁰VELAA¹¹AE¹²LKA¹³DE¹⁴K¹⁵SH¹⁶AV¹⁷IL¹⁸GD¹⁹TRY²⁰G²¹SEE²²K²³G²⁴TY²⁵H: 230

tipo 1 224: LG¹IF²GG³KA⁴Q⁵EV⁶AG⁷SA⁸EV⁹K¹⁰TV¹¹NG¹²IR¹³HI¹⁴GI¹⁵AK¹⁶Q: 255

tipo 2 223: LAL¹FG²DRA³Q⁴EI⁵AG⁶SAT⁷VK⁸I⁹GE¹⁰K¹¹V¹²HE¹³I¹⁴GI¹⁵AG¹⁶KQ: 254

tipo 3 231: LAL¹FG²DRA³Q⁴EI⁵AG⁶SAT⁷VK⁸I⁹GE¹⁰K¹¹V¹²HE¹³I¹⁴GI¹⁵AG¹⁶KQ: 262

FIGURA 11

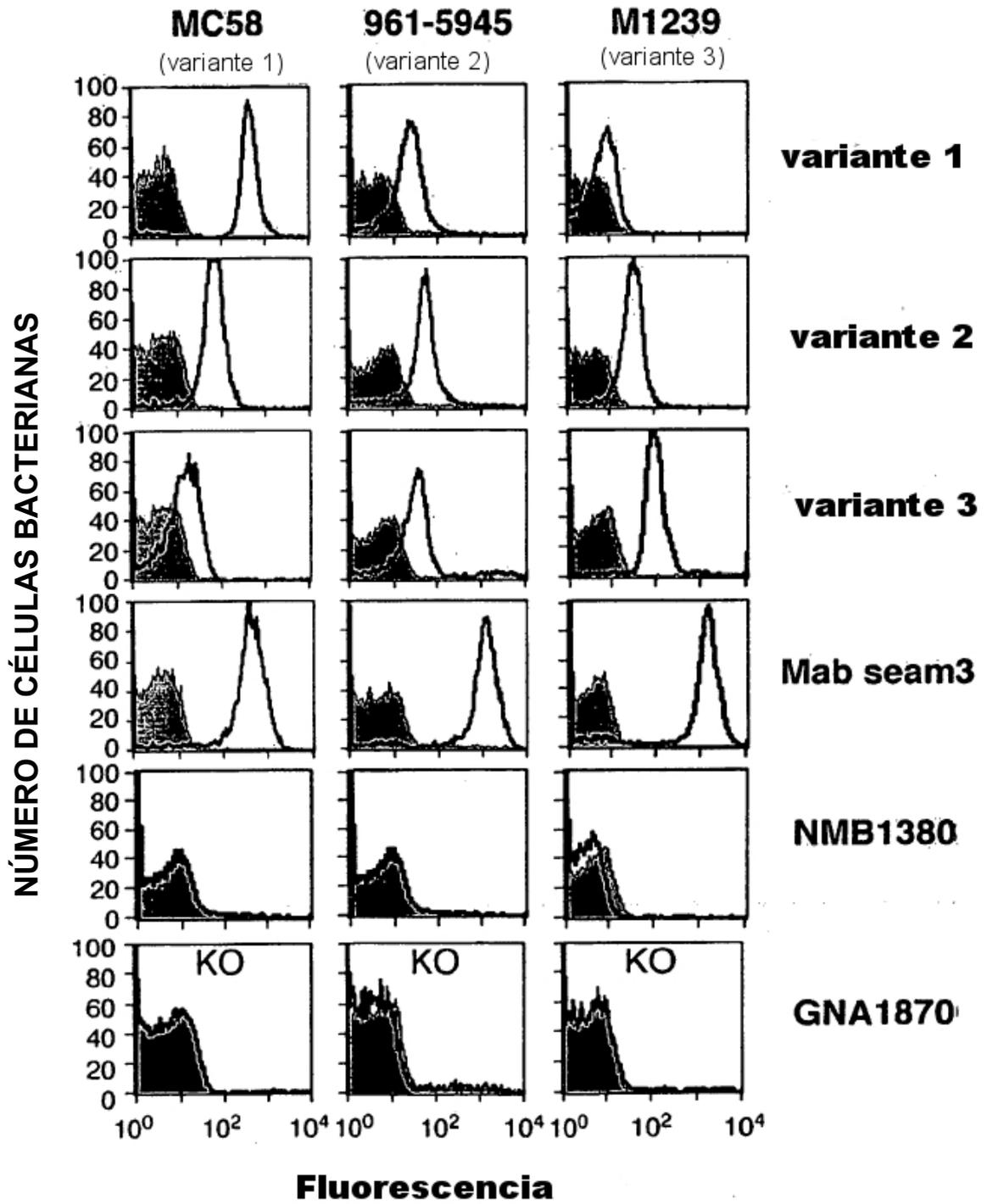


FIGURA 12

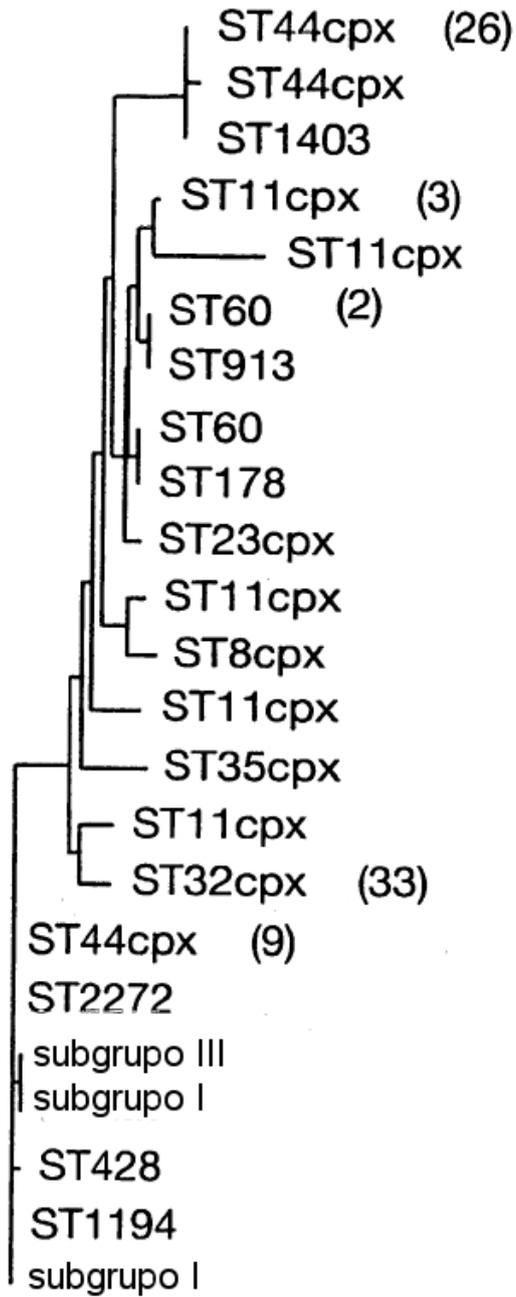


FIGURA 13

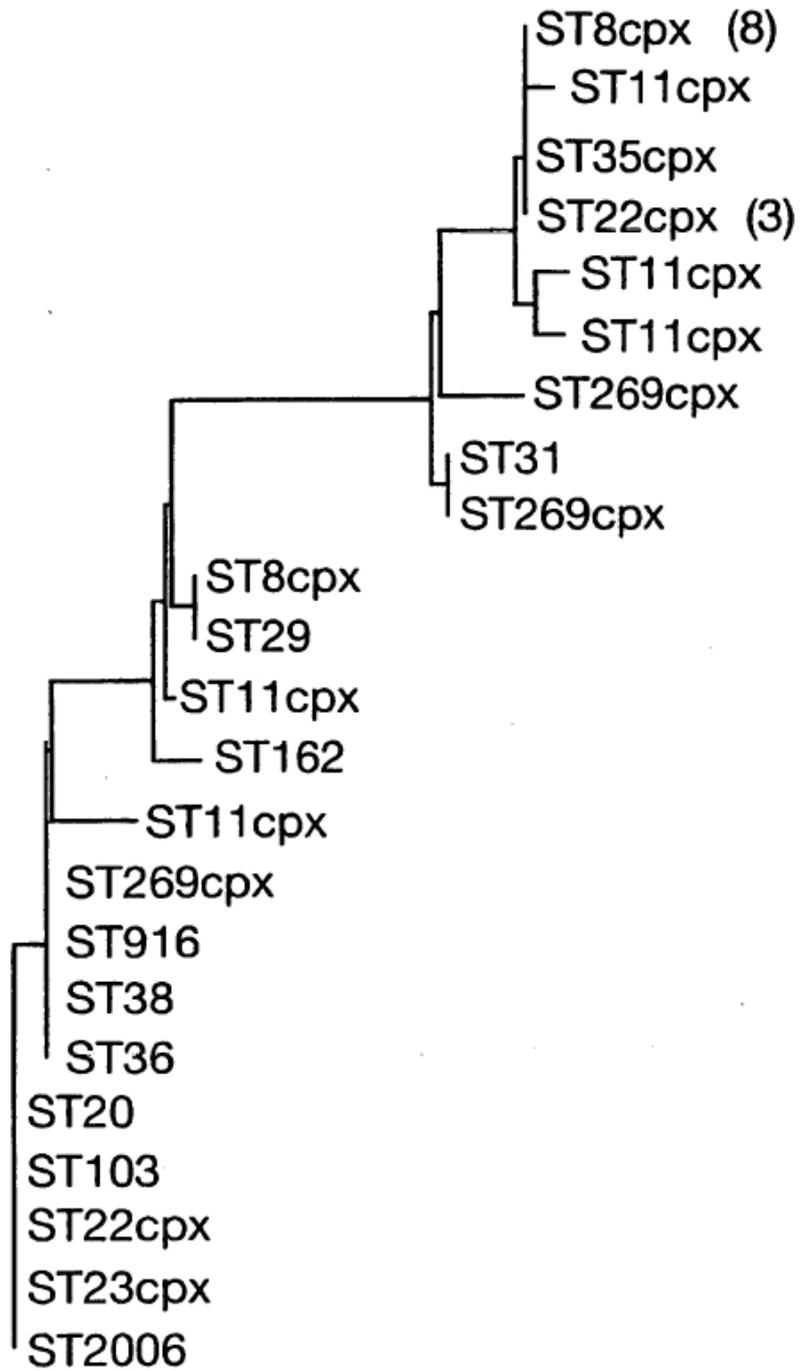


FIGURA 14

