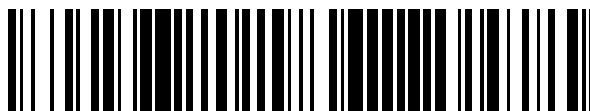


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 667**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2000 E 10180438 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2290083**

54 Título: **Antígenos Neisseriales conservados**

30 Prioridad:

30.04.1999 GB 9910168

09.03.2000 GB 0005728

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

17.11.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)**

**Via Fiorentina 1
53100 Siena (SI), IT**

72 Inventor/es:

RAPPUOLI, RINO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 522 667 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).

Antígenos *Neisseriales* conservados

DESCRIPCIÓN

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a antígenos de bacterias del género *Neisseria* conservados.

10 **Antecedentes de la técnica**

Las bacterias *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* son diplococos gram negativos, inmóviles, que son patógenos en seres humanos.

15 Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado 12 serogrupos de *N. meningitidis*. El grupo A es el patógeno más frecuentemente implicado en enfermedades epidémicas en el África subsahariano. Los serogrupos B y C son los responsables de la inmensa mayoría de los casos en los Estados Unidos y en países más desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en los Estados Unidos y en países desarrollados.

20 La vacuna meningocócica actualmente en uso es una vacuna polisacárida tetravalente compuesta por los serogrupos A, C, Y y W135. Sin embargo, esta estrategia no puede usarse para el Meningoco B, porque el polisacárido capsular del menB es un polímero de ácido N-acetil neuramínico unido a $\alpha(2-8)$ que está también presente en el tejido de mamíferos. Una estrategia de una vacuna para el menB utiliza mezclas de proteínas de membrana externa (PME). Para superar la variabilidad antigénica, se han construido vacunas multivalentes que
25 contienen hasta nueve porinas diferentes [por ejemplo, Poolman (1992) *Development of a meningococcal vaccine. Infect. Agents Dis.* 4: 13-28]. Otras proteínas utilizadas en vacunas de membrana externa han sido las proteínas opa y opc, pero ninguna de estas estrategias han podido superar la variabilidad antigénica [por ejemplo, Ala'Aldeen y Borriello (1996) The meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains. *Vaccine* 14(1): 49-53].

30 En los documentos WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280 y WO00/22430 se desvela una gran cantidad de proteínas y secuencias de nucleótidos de *Neisseria*. Tettelin y col. en [Science (2000) 287: 1809-1815] desvelan datos exhaustivos de secuencias de la cepa MC58.

35 **Descripción de la invención**

Para garantizar un reconocimiento y una reactividad máximos de cepas cruzadas, pueden usarse regiones de proteínas que están conservadas entre diferentes especies, serogrupos y cepas de *Neisseria*. Por lo tanto, la invención proporciona proteínas que comprenden tramos de secuencias de aminoácidos compartidos en la mayor
40 parte del género *Neisseria*, particularmente en *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.

La invención presenta una proteína que comprende un fragmento de una proteína de *Neisseria* según se define en las reivindicaciones.

45 El fragmento comprende una región antigénica o inmunogénica de la proteína de *Neisseria*.

Un aminoácido "conservado" es un aminoácido que, en una proteína de *Neisseria* concreta, está presente al menos en un x % de *Neisseria*. El valor de x puede ser de 50% o mayor, por ejemplo de 66%, 75%, 80%, 90%, 95% o incluso de 100% (es decir, el aminoácido se encuentra en la proteína en cuestión en todo el género *Neisseria*).

50 Para determinar si un aminoácido está "conservado" en una proteína *Neisserial* concreta, es necesario comparar este resto de aminoácido en las secuencias de la proteína en cuestión a partir de una pluralidad de diferentes especies de *Neisseria* (una "población de referencia"). La población de referencia puede incluir diversas especies de *Neisseria* diferentes (preferentemente *N. meningitidis* y *N.gonorrhoeae*) o puede incluir una sola especie. La población de referencia puede incluir diversos serogrupos diferentes de una especie concreta (tales como los serogrupos A, B, C, W135, X, Y, Z y 29E de *N. meningitidis*) o un solo serogrupo. La población de referencia también puede incluir diversas cepas diferentes de un serogrupo concreto (tales como las cepas NG6/88, BZ198, NG3/88, 297-0, BZ147, BZ169, 528, BZ133, NGE31, NGH38, NGH15, BZ232, BZ83 y 44/76 de *N. meningitidis B*). Una población de referencia preferida consta de las 5 cepas más comunes de *N. meningitidis* y/o de las 5 cepas más
55 comunes de *N. gonorrhoeae*.

60 La población de referencia comprende preferentemente cepas k extraídas de diferentes ramas k de un árbol filogenético adecuado, tales como los descritos en (a) Ni y col. (1992) *Epidemiol Infect* 109: 227-239 (b) Wolff y col. (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 4657 (c) Bygraves y Maiden (1992) *J. Gen. Microbiol.* 138: 523-531 (d) Caugant y col. (1987) *J. Bacteriol.* 69: 2781-2792. Otro árbol filogenético que puede usarse se muestra en la Figuras 8 y 9b del presente documento. Otro árbol filogenético que puede utilizarse se muestra en la Figura 2 del presente documento,

y otro en la Figura 4.

Se apreciará que, en la población de referencia, sólo se incluirá una especie, serogrupo o cepa concretos, si ésta codifica la proteína en la cual se localiza el aminoácido en cuestión. En el caso de aminoácidos incluidos en la ORF40, descrita más adelante, la población de referencia no debe incluir *N. gonorrhoeae* porque esta especie no contiene la ORF40.

Para proteínas solo encontradas en *N. meningitidis*, una población de referencia preferida comprende:

- *N. meningitidis* A, cepa Z2491
- *N. meningitidis* B, cepa NG6/88
- *N. meningitidis* W, cepa A22
- *N. gonorrhoeae*, cepa Ng F62

Estas se describen en (a) Seiler A. et al. (1996) Mol. Microbiol. 19(4): 841 - 856 (b) Maiden et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3140 - 3145 (c) Virji et al. (1992) Mol. Microbiol. 6: 1271 - 1279 (d) Dempsey et al. (1991) J. Bacteriol. 173: 5476 - 5486.

Sin embargo, para las proteínas encontradas únicamente en *N. meningitidis*, una población de referencia preferente comprende:

- *N.meningitidis* A, cepa Z2491
- *N.meningitidis* B, cepas NG6 / 88
- *N.meningitidis* W, cepas A22

Las secuencias de aminoácidos de diferentes *Neisserias* pueden compararse fácilmente usando ordenadores. Típicamente esto implicará el alineamiento de diversas secuencias usando un algoritmo tal como CLUSTAL [Thompson y col. (1994) Nucleic Acids Res 22: 4673=4680; Trends Biochem Sci (1998) 23: 403-405] o, preferentemente, PILEUP [parte del paquete informático GCG de Wisconsin, preferentemente la versión 9.0].

Los aminoácidos conservados se aprecian fácilmente en un alineamiento de secuencias múltiple - en la posición del aminoácido en cuestión un gran parte de las secuencias alineadas contendrán el aminoácido en particular. Los aminoácidos conservados pueden apreciarse más visualmente usando un programa tal como BOXSHADE [disponible, por ejemplo, on-line en el NIH], PRETTYBOX [GCG] Wisconsin, versión 10] o JALVIEW [disponible on-line en el EBI].

La invención presenta también una proteína que comprende una de las secuencias que se muestran en las Figuras.

Preferentemente, la proteína comprende un fragmento de una de las proteínas desveladas en los documentos WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280 o WO00/22430, o un fragmento de una de las 2158 ORF desveladas por Tettelin y col. en [Science (2000) 287:1809-1815]. Más particularmente, la proteína comprende preferentemente un fragmento de la ORF40. La proteína de la invención no comprenderá ninguna secuencia de las proteínas explícitamente desveladas en los documentos WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280, WO00/22430 o por Tettelin y col.

La invención también proporciona una proteína que comprende una de las secuencias mostradas en las Figuras.

Las proteínas de la invención pueden prepararse, por supuesto, mediante diversos medios (por ejemplo, por expresión recombinante, expresión natural, purificación a partir de cultivo celular, síntesis química, etc.) y en diversas formas (por ejemplo, natural, fusiones, etc.). Preferentemente, se preparan de una forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente libre de otras proteínas Neisseriales o células huésped).

También se desvelan anticuerpos que se unen a estas proteínas. Éstos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden producirse mediante cualquier medio adecuado.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona ácido nucleico que codifica las proteínas de la invención. También debe apreciarse que la invención proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias complementarias a éstos (por ejemplo para fines antisentido o exploración).

Adicionalmente, la invención proporciona ácido nucleico que puede hibridarse con el ácido nucleico de *N. meningitidis* desvelado en los ejemplos, preferentemente en condiciones de "alta rigurosidad" (por ejemplo 65 °C en una solución de 0,1x SSC, SDS 0,5%).

El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede prepararse, por supuesto, de diversas maneras (por ejemplo, mediante síntesis química, a partir de bibliotecas genómicas o genotecas de ADNc, a partir del propio organismo, etc.) y pueden adoptar diversas formas (por ejemplo, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas, etc.).

Además, la expresión "ácido nucleico" incluye ADN y ARN y también sus análogos, tales como los que contienen estructuras modificadas y también ácidos nucleicos peptídicos (ANP), etc.

5 De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona vectores que comprenden secuencias de nucleótidos de la invención (por ejemplo vectores de expresión) y células huésped transformadas con ellas.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden proteínas y/o ácidos nucleicos de la invención. Estas composiciones pueden ser adecuadas, por ejemplo, como vacunas, o como reactivos para diagnóstico, o como composiciones inmunogénicas.

10 La invención también proporciona ácidos nucleicos, o proteínas de acuerdo con la invención, para su uso como medicamentos (por ejemplo como vacunas) o como reactivos para diagnóstico. También proporciona el uso de ácido nucleico, o proteínas de acuerdo con la invención en la preparación de: (i) un medicamento para el tratamiento o prevención de infección debida a bacterias Neisseriales; (ii) un reactivo para diagnóstico para detectar la presencia de bacterias Neisseriales o de antibióticos suscitados contra bacterias Neisseriales; y/o (iii) un reactivo que puede suscitar anticuerpos contra bacterias Neisseriales. El uso es preferentemente aplicable a todas las especies de *Neisseria*.

20 Cuando una proteína Neisserial contiene más de un q % de aminoácidos conservados, la invención proporciona el uso de la proteína Neisserial, o un fragmento de la misma, como una proteína no específica de cepa que presenta reactividad cruzada entre muchas especies, serogrupos y cepas. El valor de q puede ser de 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o incluso de 100%.

25 La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar a un paciente, que comprende administrar al mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nucleico, proteína y/o anticuerpo de acuerdo con la divulgación. De acuerdo con otros aspectos, la invención proporciona diversos procedimientos.

30 Se proporciona un procedimiento para producir proteínas de la invención que comprende la etapa de cultivar una célula huésped de acuerdo con la invención en condiciones en las que se induce la expresión de proteína.

Se proporciona un procedimiento para producir la proteína o el ácido nucleico de la invención, en el que la proteína o el ácido nucleico se sintetizan en todo o en parte mediante procedimientos químicos.

35 Se proporciona un procedimiento para detectar polinucleótidos de la invención, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una sonda nucleica de acuerdo con la invención con una muestra biológica en condiciones de hibridación para formar dúplex; y (b) detectar dichos dúplex.

40 Se proporciona un procedimiento para detectar proteínas de la invención que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un anticuerpo de acuerdo con la invención con una muestra biológica en condiciones adecuadas para la formación de un complejo anticuerpo-antígeno; y (b) detectar dichos complejos.

45 A continuación se proporciona un resumen de las técnicas y procedimientos convencionales que pueden emplearse para realizar la invención (por ejemplo, utilizar las secuencias desveladas para la vacunación o a efectos de diagnóstico). Este resumen no es una limitación de la invención, los ejemplos proporcionados pueden usarse, pero no son necesarios.

General

50 La realización práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, por ejemplo, Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989); *DNA Cloning, Volúmenes I y II* (D.N Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed, 1984); *Acid Nucleic Hybridization* (B.D. Hames y S.J. Higgins eds. 1984); *Transcription and Translation* (B.D. Hames y S.J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); la serie de *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.), especialmente los volúmenes 154 y 155; *Gene Transference Vector for the Mammalian Cells* (J.H. Miller y M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer y Walker, eds. (1987), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Scopes, (1987) *Protein Purification: Principles and Practice*, Segunda Edición (Springer-Verlag, N.Y.), y *Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV* (D.M. Weir y C. C. Blackwell eds 1986).

En la presente memoria descriptiva se usan las abreviaturas convencionales de los nucleótidos y aminoácidos.

Definiciones

65 Una composición que contienen X está "sustancialmente libre de Y" cuando al menos el 85% en peso del total de

X+Y en la composición es X. Preferentemente, X comprende al menos aproximadamente el 90% en peso del total de X+Y en la composición, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% o incluso el 99% en peso.

5 La expresión "que comprende" significa "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X, o puede incluir algo adicional a X, tal como X+Y.

10 El término "heterólogo" se refiere a dos componentes biológicos que, por naturaleza, no se encuentran juntos. Los componentes pueden ser células huésped, genes o regiones reguladoras, tales como promotores. Aunque los componentes heterólogos no se encuentren juntos por naturaleza, pueden funcionar conjuntamente, como cuando un promotor heterólogo a un gen está unido operativamente al gen. Otro ejemplo es cuando una secuencia de *Neisseria* es heteróloga a una célula huésped de ratón. Otro ejemplo sería el de dos epítomos de proteínas iguales o diferentes que se han ensamblado en una sola proteína en una disposición que no aparece en la naturaleza.

15 Un "origen de replicación" es una secuencia de polinucleótidos que inicia y regula la replicación de polinucleótidos, tal como un vector de expresión. El origen de replicación se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos dentro de una célula, capaz de replicación bajo su propio control. Para que un vector se replique en una célula huésped particular se necesita un origen de replicación. Con algunos orígenes de replicación, puede reproducirse un vector de expresión con un número elevado de copias en presencia de las proteínas adecuadas dentro de la célula. Son ejemplos de orígenes las secuencias de replicación autónoma, que son eficaces en levaduras; y el antígeno viral T, eficaz en células COS-7.

20 Una secuencia "mutante" se define como una secuencia de ADN, ARN o aminoácidos que se diferencia de, pero tiene identidad de secuencia, la secuencia natural o desvelada. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de identidad de secuencia entre la secuencia natural o desvelada y la secuencia mutante es preferentemente mayor del 50% (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% y 99% o más, calculada usando el algoritmo de Smith-Waterman descrito anteriormente). Tal como se usa en el presente documento, una "variante alélica" de una molécula o región de ácido nucleico, para la que dicha secuencia de ácido nucleico se proporciona en el presente documento, es una molécula o región de ácido nucleico que se produce esencialmente en el mismo locus del genoma de otro o segundo aislado, y que, debido a la variación natural causada, por ejemplo, por mutación o recombinación, tiene una secuencia de ácido nucleico similar pero no idéntica. Una región codificante de variante alélica codifica típicamente una proteína que tiene una actividad similar a la de la proteína codificada por el gen con el que se compara. Una variante alélica también puede comprender una modificación en las regiones 5' ó 3' no traducidas del gen, tales como en las regiones reguladoras de control (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5.753.235).

35 Sistemas de expresión

Las secuencias de nucleótidos de *Neisseria* pueden expresarse en una variedad de diferentes sistemas de expresión; por ejemplo, los que se usan en células de mamífero, baculovirus, plantas, bacterias y levadura.

40 i. Sistemas de Mamífero

45 Los sistemas de expresión de mamífero son conocidos en la técnica. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse con la ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, de un gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción, que normalmente se localiza cerca del extremo 5' de la secuencia codificante, y una caja TATA, normalmente ubicada 25-30 pares de bases (pb) cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se piensa que la caja TATA dirige la ARN polimerasa II para que comience la síntesis del ARN el sitio adecuado. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor cadena arriba, normalmente localizado de 100 a 200 pb cadena arriba de la caja TATA. Un elemento promotor cadena arriba determina la velocidad a la que se inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación [Sambrook y col. (1989) "Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells." In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed.].

55 Los genes virales de mamífero se expresan a menudo a niveles elevados y tienen un amplio intervalo de huéspedes; por lo tanto las secuencias que codifican genes virales de mamífero proporcionan secuencias promotoras que son del particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluye el promotor temprano SV40, el promotor LTR del virus del tumor de mama en ratones, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP), y el promotor del virus del herpes simple. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de la metalotionina murina, también proporcionan secuencias promotoras útiles. La expresión puede ser constitutiva o regulada (inducible), dependiendo de si el promotor puede inducirse con glucocorticoides en células sensibles a hormonas.

60 La presencia de un elemento potenciador (potenciador), combinado con los elementos promotores descritos anteriormente, aumentará normalmente los niveles de expresión. Un potenciador es una secuencia de ADN reguladora que puede estimular la transcripción hasta 1000 veces cuando se une a promotores homólogos o heterólogos, comenzando la síntesis en el sitio de inicio normal del ARN. Los potenciadores también son activos cuando se colocan cadena arriba o cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción, en cualquier orientación normal o girada, o a una distancia de más de 1000 nucleótidos desde el promotor [Maniatis y col. (1987) Science

- 236: 1237; Alberts y col. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2ª ed.]. Los elementos potenciadores derivados de virus pueden ser particularmente útiles, debido a que normalmente tienen un intervalo de huésped más amplio. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador del gen temprano SV40 [Dijkema y col (1985) *EMBO J.* 4: 761] y los promotores/potenciadores derivados de la repetición terminal larga (LTR) del Virus del Sarcoma de Rous [German y col. (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 6777] y del citomegalovirus humano [Boshart y col. (1985) *Cell* 41: 521]. Adicionalmente, algunos potenciadores pueden regularse, y sólo son activos en presencia de un inductor, tal como una hormona o ión metálico [Sassone-Corsi y Borelli (1986) *Trends Genet.* 2: 215; Maniatis y col. (1987) *Science* 236: 1237].
- 5
- 10 Una molécula de ADN puede expresarse intracelularmente en células de mamífero. Una secuencia promotora puede unirse directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N de la proteína recombinante siempre será una metionina, codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, el extremo N puede escindirse de la proteína por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.
- 15 Como alternativa, a partir de la célula en el medio de cultivo también pueden secretarse proteínas extrañas creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión, comprendida por un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de las proteínas extrañas en las células de mamífero. Preferentemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que pueden escindirse tanto *in vivo* como *in vitro*. El fragmento de secuencia líder normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. El líder tripartito del adenovirus es un ejemplo de una secuencia líder que proporciona la secreción de las proteínas extrañas en las células de mamífero.
- 20
- Normalmente, las secuencias de finalización de la transcripción y de poliadenilación que reconocen las células de mamíferos son regiones reguladoras localizadas en 3' con respecto al codón de terminación de la traducción y por tanto, junto con los elementos promotores, flanquean la secuencia codificante. El extremo 3' del ARNm maduro se forma por escisión post-transcripcional específica de sitio y poliadenilación [Birnstiel y col. (1985) *Cell* 41: 349; Proudfoot y Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. En *Transcription and splicing* (ed. B.D. Hames y D.M. Glover); Proudfoot (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14: 105]. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede traducirse en el polipéptido codificado por el ADN. Entre los ejemplos de señales de terminación de la transcripción/poliadenilación se incluyen las derivadas del SV40 [Sambrook y col (1989) "Expression of cloned genes in cultured mammalian cells." In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].
- 25
- 30
- Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción, se ponen juntos en las construcciones de expresión. Si se desea, en una construcción de expresión también pueden incluirse potenciadores, intrones con sitios funcionales aceptores y donantes de corte y empalme y secuencias líder. A menudo, las construcciones de expresión se conservan en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaces de conservarse de forma estable en un huésped, tales como células de mamífero o bacterias. Los sistemas de replicación en mamífero incluyen los derivados de virus animales que requieren factores de trans-activación para replicarse. Por ejemplo, plásmidos que contienen los sistemas de replicación del papovavirus, tal como el SV40 [Gluzman (1981) *Cell* 23: 175] o del poliomavirus, se replican con un número de copias extremadamente elevado en presencia del antígeno T viral apropiado. Otros ejemplos de replicones de mamífero incluyen los derivados del papilomavirus bovino y del virus Epstein-Barr. Adicionalmente, el replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que permite por tanto mantenerse, por ejemplo, en células de mamífero para la expresión y en un huésped procariota para la clonación y amplificación. Entre los ejemplos de dichos vectores lanzadera bacteria-mamífero se incluyen pMT2 [Kaufman y col. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 946] y pHEBO [Shimizu y col. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 1074].
- 35
- 40
- 45
- El procedimiento de transformación usado depende del huésped que vaya a transformarse. Los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada con dextrano, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada con polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido (o polinucleótidos) en liposomas, y microinyección directa de ADN en los núcleos.
- 50
- 55 Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica, e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la colección americana de cultivos tipo (ATTC), incluyendo pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de cría de hámster (BHK), células renales de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y otras numerosas líneas celulares.
- 60
- 65

ii. Sistemas de Baculovirus

Los polinucleótidos que codifican las proteínas también pueden insertarse en un vector de expresión de insecto adecuado, y se une operativamente a los elementos de control dentro de dicho vector. La construcción de vectores emplea técnicas conocidas en la técnica. Generalmente, los componentes del sistema de expresión incluyen un vector de transferencia, normalmente un plásmido bacteriano que contiene tanto un fragmento de genoma de baculovirus como un sitio de restricción conveniente para la inserción de un gen o genes heterólogos a expresar; un baculovirus de tipo silvestre con una secuencia homóloga a la del fragmento específico del baculovirus en el vector de transferencia (esto permite la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma del baculovirus); y células huésped de insecto adecuadas y un medio de cultivo.

Después de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el vector de transferencia, el vector y el genoma viral de tipo silvestre se transfectan en la célula huésped de insecto donde se permite que el vector y el genoma viral se recombinen. El virus recombinante empaquetado se expresa y las placas recombinantes se identifican y purifican. En el comercio se dispone de materiales y procedimientos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "Maybach"). Los expertos en la técnica conocen generalmente estas técnicas que se describen por completo en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Boletín N.º. 1555 (1987) (en lo sucesivo, en el presente documento, "Summers y Smith").

Antes de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el genoma del baculovirus, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una secuencia codificante líder (si se desea) de interés, y una secuencia de terminación de la transcripción, normalmente se ensamblan en una construcción intermedia de trans-colocación (vector de transferencia). Esta construcción puede contener un único gen y elementos reguladores unidos operativamente; genes múltiples, cada uno de los cuales con su propio conjunto de elementos reguladores unidos operativamente; o genes múltiples, regulados por el mismo conjunto de elementos reguladores. Las construcciones intermedias de trans-colocación a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (*por ejemplo*, plásmidos), capaces de mantenerse establemente en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, lo que le permite mantenerse en un huésped adecuado para la clonación y amplificación.

Actualmente, el vector de transferencia más usado para introducir genes extraños en AcNPV es pAc373. También se han diseñado muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la técnica. Entre estos se incluye, por ejemplo, pVL985 (que modifica el codón de inicio de polihedrina desde ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases cadena abajo del ATT; véase Luckow y Summers, *Virology* (1989) 17: 31. El plásmido normalmente contiene también la señal de poliadenilación de la polihedrina ((Miller y col. (1988) *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 177) y un gen procarriota de resistencia a la ampicilina (*amp*) y un origen de replicación para la selección y propagación en *E. coli*.

Los vectores de transferencia de baculovirus normalmente contienen un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de unir una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar la transcripción cadena abajo (5' a 3') de la secuencia codificante (*por ejemplo*, un gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que se localiza normalmente cerca del extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un vector de transferencia de baculovirus también puede tener un segundo dominio denominado potenciador, que, si está presente, normalmente es distal al gen estructural. La expresión puede ser regulada o constitutiva.

Los genes estructurales, que se transcriben abundantemente en los últimos momentos del ciclo de infección viral, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluyen secuencias derivadas del gen que codifica la proteína poliédrica viral Friesen y col., (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression," in: *The Molecular Biology of Baculoviruses* (ed. Walter Doerfler); EPO Publ. N.º 127 839 y 155 476; y el gen que codifica la proteína p10, Vlák y col., (1988), *J. Gen. Virol.* 69: 765.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivar de genes de proteínas de insecto o baculovirus secretadas, tales como el gen de polihedrina de baculovirus (Carbonell y col. (1988) *Gene*, 73: 409). Como alternativa, dado que parece que las células de insecto reconocen las señales de las modificaciones post-traduccionales de células de mamífero (tal como la señal de escisión peptídica, escisión proteolítica y fosforilación) y que las señales necesarias para la secreción y acumulación nuclear también parecen conservarse entre las células de invertebrado y las células de vertebrado, líderes de origen no insecto, tales como las derivadas de genes que codifican el α interferón humano Maeda y col., (1985), *Nature* 315: 592; péptido liberador de gastrina humano, Lebacqz-Verheyden y col., (1988), *Molec. Cell. Biol.* 8: 3129; IL-2 humana, Smith y col., (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 8404; IL-3 de ratón, (Miyajima y col., (1987) *Gene* 58: 273; y glucocerebrosidasa humana, Martin y col. (1988) *DNA*, 7: 99, también pueden usarse para proporcionar la secreción en insectos.

Un polipéptido o poliproteína recombinante puede expresarse intracelularmente o, si se expresa con las secuencias reguladoras apropiadas, puede secretarse. La buena expresión intracelular de proteínas extrañas no fusionadas requiere normalmente genes heterólogos que tengan idealmente una secuencia líder corta que contenga señales adecuadas de inicio de la traducción precedentes a una señal de inicio ATG. Si se desea, la metionina del extremo N puede escindirse de la proteína madura mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

Como alternativa, las poliproteínas o proteínas recombinantes que no secretan de manera natural pueden secretarse a partir de una célula de insecto creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en insectos. El fragmento de la secuencia líder normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico.

Después de la inserción de la secuencia de ADN y/o del gen que codifica el producto de expresión precursor de la proteína, un huésped de célula de insecto se co-transforma con el ADN heterólogo del vector de transferencia y el ADN genómico del baculovirus de tipo silvestre - normalmente por co-transfección. El promotor y la secuencia de terminación de la transcripción de la construcción normalmente comprenderán una sección de 2-5 kb del genoma del baculovirus. Los procedimientos para introducir ADN heterólogo en el sitio deseado del virus de baculovirus son conocidos en la técnica. (Véase Summers y Smith, anteriormente; Ju y col. (1987); Smith y col., *Mol. Cell. Biol.* (1983) 3: 2156; y Luckow y Summers (1989)). Por ejemplo, la inserción puede realizarse dentro de un gen, tal como el gen de la polihedrina, por recombinación homóloga por cruzamiento doble; la inserción puede realizarse también en un sitio de restricción enzimática diseñado por ingeniería genética en el gen de baculovirus deseado. Miller y col., (1989), *Bioessays* 4: 91. La secuencia de ADN, cuando se clona en lugar del gen de la polihedrina en el vector de expresión, está flanqueada en 5' y 3' por secuencias específicas de la polihedrina y se coloca cadena abajo del promotor de la polihedrina.

El vector de expresión de baculovirus recién formado se empaqueta posteriormente en un baculovirus recombinante infeccioso. La recombinación homóloga se produce con baja frecuencia (entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 5%); por tanto, la mayoría de los virus producidos después de la co-transfección siguen siendo virus de tipo silvestre. Por lo tanto, se necesita un procedimiento para identificar los virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es una selección visual que permite diferenciar los virus recombinantes. La proteína polihedrina, que se produce en el virus natural, se produce a niveles muy elevados en los núcleos de las células infectadas en los últimos estadios tras la infección vírica. La proteína polihedrina acumulada forma cuerpos de oclusión que también contienen partículas embebidas. Estos cuerpos de oclusión, de hasta 15 µm de tamaño, son muy refractarios, lo que les proporciona un aspecto lustroso brillante que es fácil de observar al microscopio óptico. Las células infectadas con virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para diferenciar virus recombinantes de virus de tipo silvestre, el sobrenadante de la transfección se coloca en placas sobre una monoplaca de células de insecto mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia. En concreto, las placas se seleccionan al microscopio óptico para detectar la presencia (indicativa de virus de tipo silvestre) o ausencia (indicativa de virus recombinante) de cuerpos de oclusión. "*Current Protocols in Microbiology*" Vol. 2 (Ausubel y col. eds) en 16.8 (Supl. 10, 1990); Summers y Smith, citados anteriormente; Miller y col. (1989).

Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para infección en diversas células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni* (documento WO 89/046699; Carbonell y col., (1985) *J. Viral.* 56: 153; Wright (1986) *Nature* 321: 718; Smith y col., (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156; y véase generalmente, Fraser, y col. (1989) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25:225).

Las células y los medios de cultivo celulares se encuentran disponibles en el mercado para la expresión directa y por fusión de polipéptidos heterólogos en un sistema de expresión/baculovirus; la tecnología del cultivo celular es generalmente conocida por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Summers y Smith, citados anteriormente. Después, las células de insecto modificadas pueden cultivarse en un medio nutriente apropiado, que permite el mantenimiento estable del plásmido (o plásmidos) presente en el huésped de insecto modificado. Cuando el producto de expresión génico está bajo el control inducible, el huésped puede crecer hasta una densidad elevada y la expresión se induce. Como alternativa, cuando la expresión es constitutiva, el producto se expresará de manera continua en el medio y el medio nutriente debe estar circulando continuamente, eliminando al mismo tiempo el producto de interés y aumentando los nutrientes consumidos. El producto puede purificarse mediante técnicas cromatográficas, tales como, por ejemplo, HPLC, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.; electroforesis; centrifugación en gradiente de densidad; extracción con disolvente o similar. Según sea apropiado, el producto también puede purificarse, si fuese preciso, para eliminar sustancialmente cualquier proteína de insecto que también pudiera secretarse en el medio o resultase de la lisis de las células de insecto, para proporcionar un producto que esté al menos sustancialmente libre de restos del huésped, por ejemplo proteínas, lípidos y polisacáridos.

Con el fin de obtener la expresión de la proteína, las células huéspedes recombinantes derivadas de los transformantes se incuban en condiciones que permitan la expresión de la secuencia codificante de la proteína recombinante. Estas condiciones variarán, dependiendo de la célula huésped seleccionada. Sin embargo,

basándose en lo que se conoce en la técnica, los expertos habitual en la técnica puede deducir fácilmente las condiciones.

iii. Sistemas de plantas

Existen muchos cultivos de células de plantas y sistemas de expresión genéticos de plantas conocidos en la técnica. Los sistemas de expresión genéticos de células de plantas ejemplares incluyen los que se describen en las patentes, tales como las patentes de los Estados Unidos 5.693.506; 5.659.122; y 5.608.143. En Zenk, *Phytochemistry* 30: 3861-3863 (1991) se han descrito ejemplos adicionales de expresión genética en cultivos de células de plantas. Pueden encontrarse descripciones de péptidos señal de proteínas de plantas, además de las referencias descritas anteriormente, en Vaultcombe y col., *Mol. Gen. Genet.* 209: 33-40 (1987); Chandler y col., *Plant Molecular Biology* 3: 407-418 (1984); Rogers, *J. Biol. Chem.* 260: 3731-3738 (1985); Rothstein y col., *Gene* 55: 353-356 (1987); Whittier y col., *Nucleic Acids Research* 15: 2515-2535 (1987); Wirsal y col., *Molecular Microbiology* 3: 3-14 (1989); Yu y col., *Gene* 122: 247-253 (1992). Una descripción de la regulación de la expresión de genes de plantas mediante fitohormonas, ácido giberélico y enzimas secretadas inducidas por el ácido giberélico puede encontrarse en R.L. Jones y J. MacMillin, *Gibberellins en: Advanced Plant Physiology*, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, Londres, páginas 21-52. Referencias que describen otros genes regulados por el metabolismo: Sheen, *Plant Cell*, 2: 1027-1038(1990); Maas y col., *EMBO J.* 9: 3447-3452 (1990); Benkel and Hickey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1337-1339 (1987).

Típicamente, usando técnicas conocidas en la técnica, se inserta una secuencia de polinucleótidos deseada en un casete de expresión que comprende elementos reguladores genéticos diseñados para funcionamiento en plantas. El casete de expresión se inserta en un vector de expresión deseado que contiene secuencias acompañantes cadena arriba y cadena abajo del casete de expresión adecuado para la expresión en una planta huésped. Las secuencias acompañantes serán de origen plásmido o vírico, y proporcionarán al vector las propiedades necesarias para que los vectores transfieran ADN desde un huésped de clonación original, tal como una bacteria, hasta la planta huésped deseada. La construcción básica de vector bacteriano/planta proporcionará preferentemente una amplia serie de orígenes de replicación de huéspedes procariotas; un marcador de selección procariota y, para transformaciones con *Agrobacterium*, la secuencia de ADN T para la transferencia mediada con *Agrobacterium* a los cromosomas de plantas. Aunque no es fácil conseguir la detección del gen heterólogo, la construcción también tendrá preferentemente un gen marcador de selección adecuado para determinar si se ha transformado una célula de planta. En Wilink y Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr.*, 11(2): 165-185 se encuentra una revisión general de marcadores adecuados, por ejemplo, para los miembros de la familia de las herbáceas.

También se recomiendan las secuencias adecuadas para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la planta. Éstas pueden incluir las secuencias transposón y similares para recombinación homóloga, así como secuencias Ti que permiten la inserción aleatoria de un casete de expresión heterólogo en el genoma de la planta. Entre los marcadores de selección procariotas adecuados se incluyen resistencia a antibióticos como la ampicilina o tetraciclina. Como se sabe en la técnica, en el vector también pueden estar presentes otras secuencias de ADN que codifican funciones adicionales.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden incluirse en un casete de expresión para la expresión de la proteína (o proteínas) de interés. Normalmente, habrá un solo casete de expresión, aunque también son factibles dos o más. El casete de expresión recombinante contendrá, además de las secuencias codificantes de la proteína heteróloga, los siguientes elementos: una región promotora, secuencias no traducidas 5' de planta, codón de inicio, dependiendo de si el gen estructural está equipado, o no, con uno, y una secuencia de finalización de la transcripción y traducción. Los sitios de restricción enzimáticos únicos en los extremos 5' y 3' del casete permiten facilitar la inserción en un vector pre-existente.

Una secuencia codificante heteróloga puede ser para cualquier proteína relacionada con la presente invención. La secuencia que codifica la proteína de interés codificará un péptido señal que permita procesar y translocar la proteína, según sea apropiado, y normalmente carecerá de cualquier secuencia que pueda dar como resultado la unión de la proteína deseada de la invención a una membrana. Puesto que, para la mayor parte, la región de inicio de la transcripción será para un gen que se exprese y transloque durante la germinación, empleando el péptido señal que proporciona la translocación también puede proporcionarse la translocación de la proteína de interés. De esta manera, la proteína (o proteínas) de interés se traslocará desde las células en las que se expresan y pueden recogerse eficazmente. Típicamente, la secreción en semillas se realiza a través de la aleurona o capa de epitelio escutelar en el endospermo de la semilla. Aunque no es necesario que la proteína secrete desde las células en las que se produce la proteína, esto facilita el aislamiento y purificación de la proteína recombinante.

Dado que la expresión final del producto génico deseado será en una célula eucariota, será deseable determinar qué parte del gen clonado contiene las secuencias que se procesarán como intrones por la maquinaria del esplicósoma del huésped. Si es así, puede realizarse mutagénesis dirigida al sitio de la región "intrón" para evitar la pérdida de una parte del mensaje genético en forma de un falso código de intrón, Reed y Maniatis, *Cell* 41: 95-105, 1985.

El vector puede microinyectarse directamente en las células de las plantas mediante micropipetas para transferir

mecánicamente el ADN recombinante. Crossway, *Mol. Gen. Genet.*, 202: 179-185, 1985. El material genético también puede transferirse a la célula de la planta usando polietilenglicol, Krens, y col., *Nature*, 296, 72-74, 1982. Otro procedimiento de introducción de segmentos de ácido nucleico es la penetración balística de alta velocidad mediante partículas pequeñas en el ácido nucleico, ya sea dentro de la matriz de perlas pequeñas o partículas, o en la superficie Klein, y col., *Nature*, 327, 70-73, 1987 y Knudsen y Muller, 1991, *Planta*, 185: 330-336 explican el bombardeo de partículas en el endospermo de cebada para crear cebada transgénica. Otro procedimiento más de introducción sería la fusión de protoplastos con otras entidades tanto mini células como células, lisosomas u otros cuerpos de superficie lipídica que pueden fusionarse, Fraley, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1859-1863, 1982.

El vector también puede introducirse en las células de plantas por electroporación. (Fromm y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82: 5824, 1985). En esta técnica, los protoplastos de plantas se someten a electroporación en presencia de plásmidos que contienen la construcción génica. Impulsos eléctricos de campo alto permeabilizan, de manera reversible, las biomembranas, permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos de plantas sometidos a electroporación reforman la pared celular, la dividen y forman callos de plantas.

Mediante la presente invención pueden transformarse todas las plantas cuyos protoplastos pueden aislarse y cultivarse para dar plantas enteras regeneradas, de manera que las plantas completas que contienen el gen transferido se recuperan. Se sabe que prácticamente todas las plantas pueden regenerarse a partir de células o tejidos cultivados incluyendo, pero sin limitación, todas las especies principales de caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, frutales y otros árboles, legumbres y vegetales. Algunas plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, especies de los géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum* y *Datura*.

Los medios de regeneración varían de una especie de planta a otra, pero generalmente primero se proporciona una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. El tejido del callo se forma y, a partir del callo, los vástagos pueden inducirse y posteriormente enraizarse. Como alternativa, la formación de embriones puede inducirse a partir de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. El medio de cultivo generalmente contendrá diferentes tipos de aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citoquininas. Sería también ventajoso añadir medio ácido glutámico y prolina, especialmente para especies como maíz y alfalfa. Los vástagos y las raíces se suelen desarrollar simultáneamente. La generación eficaz dependerá del medio, del genotipo y del historial del cultivo. Si estas tres variables se controlan, entonces la generación es completamente reproducible y puede repetirse.

En algunos sistemas de cultivo de células de plantas, la proteína deseada de la invención puede excretarse o, como alternativa, la proteína puede extraerse de la planta completa. Cuando la proteína deseada de la invención se secreta al medio, puede recogerse. Como alternativa, los embriones y las semillas semi-embriónicas u otro tejido de la planta puede romperse mecánicamente para liberar cualquier proteína secretada entre las células y los tejidos. La mezcla puede suspenderse en una solución tampón para recoger las proteínas solubles. A continuación se usarán procedimientos convencionales de aislamiento y purificación de proteínas para purificar la proteína recombinante. Para optimizar la expresión y recuperación de la proteína heteróloga, se ajustaran los parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno y volumen mediante procedimientos rutinarios.

iv. Sistemas bacterianos.

En la técnica se conocen técnicas de expresión bacteriana. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse con la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en un ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que normalmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano puede tener también un segundo dominio denominado operador, que puede solapar un sitio de unión de la ARN polimerasa adyacente al cual se inicia la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), como una proteína de gen represor que puede unir el operador y, por lo tanto, inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva puede producirse en ausencia de elementos de regulación negativa, tal como el operador. Además, la regulación positiva puede conseguirse mediante una secuencia de proteína de unión de un gen activador que, si está presente, está normalmente próxima (5') a la secuencia de unión de la ARN polimerasa. Un ejemplo de proteína de un gen activador es la proteína activadora de catabolito (PAC), que ayuda a iniciar la transcripción del operón *lac* en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud y col. (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18: 173]. La expresión regulada puede por tanto ser positiva o negativa, mejorando o reduciendo, de esta forma, la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, tales

como galactosa, lactosa (*lac*) [Chang y col. (1977) *Nature* 198: 1056], y maltosa. Otros ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (*trp*) [Goeddel y col. (1980) *Nuc. Acids Res.* 8: 4057; Yelverton y col. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9: 731; Patente de Estados Unidos 4.738.921; documentos EP-A-0036776 y EP-A-0121775]. El sistema promotor de la *g*-laotamasa (*bla*) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes" En *Interferon 3* (ed. I. Gresser)], los sistemas promotores bacteriófago lambda PL [Shimatake y col. (1981) *Nature* 292: 128] y T5 [Patente de Estados Unidos 4.689.406] también proporcionan secuencias promotores útiles.

Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también actúan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor de bacteria o bacteriófago puede unirse con las secuencias de operón de otro promotor de bacteria o bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [Patente de Estados Unidos 4.551.443]. Por ejemplo, el promotor *tac* es un promotor *trp-lac* híbrido formado por las secuencias del promotor *trp* y del operón *lac* que se regulan mediante el represor *lac* [Amann y col. (1983) *Gene* 23: 167; de Boer y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores de aparición natural de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unirse con la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor de origen natural de origen no bacteriano también puede acoplarse con una ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema ARN polimerasa del bacteriófago T7 / promotor es un ejemplo de sistema promotor adecuado [Studier y col. (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113; Tabor y col. (1985) *Proc Natl. Acad. Sci.* 82: 1074]. Además, un promotor híbrido también puede comprender un promotor de bacteriófago y una región operador de *E. coli* (documento EPO-A-0 267 851).

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

Una molécula de ADN puede expresarse intracelularmente. Una secuencia promotora puede unirse directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N siempre será una metionina, codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina del extremo N puede escindirse de la proteína por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o incubando tanto *in vivo* como *in vitro* con una peptidasa metionina N terminal bacteriana (documento EPO-A-0 219 237).

Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a la expresión directa. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la parte N terminal de una proteína bacteriana endógena, u otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de las secuencias codificantes heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen celular del bacteriófago lambda puede unirse al extremo 5' de un gen extraño y expresarlo en la bacteria. La proteína de fusión resultante conserva preferentemente un sitio para el procesamiento de una enzima (factor Xa) para escindir la proteína del bacteriófago procedente del gen extraño [Nagai y col. (1984) *Nature* 309: 810]. Las proteínas de fusión también pueden fabricarse con secuencias procedentes de los genes *lacZ* [Jia y col. (1987) *Gene* 60: 197], *trpE* [Allen y col. (1987) *J. Biotechnol.* 5: 93; Makoff y col. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135: 11] y Chey [documento EP-A-0 324 647]. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos puede codificar o no un sitio que puede escindirse. Otro ejemplo es la proteína de fusión ubiquitina. Dicha proteína de fusión se fabrica con la región ubiquitina que conserva preferentemente un sitio de procesamiento de enzima (por ejemplo, proteasa de procesamiento específica de la ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. Mediante este procedimiento pueden aislarse proteínas extrañas nativas [Miller y col. (1989) *Biol Technology* 7: 698].

Como alternativa, las proteínas extrañas también pueden secretarse desde la célula creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia de péptido señal que proporciona la secreción de la proteína extraña en bacterias (Patente de Estados Unidos 4.336.336). El fragmento de secuencia de señal normalmente codifica un péptido de señal comprendido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. La proteína se secreta en el medio de cultivo (bacterias gram positivas) o en el interior del espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula (bacterias gram negativas). Preferentemente existen sitios de procesamiento que pueden escindirse tanto *in vivo* como *in vitro*, codificados entre el fragmento de péptido señal y el gen extraño.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivar de genes de proteínas bacterianas secretadas tales como el gen de la proteína de la membrana externa de *E. coli* (*ompA*) [Masui y col. (1983), en: *Experimental Manipulation of Gene Expression*; Ghayeb y col. (1984) *EMBO J.* 3: 2437] y la secuencia señal de la fosfatasa alcalina de *E. coli* (*phoA*) [Oka y col. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7212]. Como ejemplo adicional, la secuencia

señal del gen de la alfa-amilasa procedente de diferentes cepas de *Bacillus* puede usarse para secretar proteínas heterólogas a partir de *B. subtilis* [Palva y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 79: 5582; documento EP-A-0 244 042].

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

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

25 Como alternativa, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración normalmente contienen al menos una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite integrar el vector. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores de integración construidos con ADN
30 procedente de diversas cepas de *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (documento (EP-A-0 127 328). Los vectores de integración también pueden comprender secuencias de bacteriófago o transposón.

Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores de selección que permiten seleccionar cepas bacterianas que se han transformado. Los marcadores de selección
35 pueden expresarse en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que hacen que las bacterias sean resistentes a fármacos tales como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina), y tetraciclina [Davies y col. (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32:469]. Los marcadores de selección pueden también incluir genes biosintéticos, tales como los que se encuentran en las rutas biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

40 Como alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente se pueden juntar en vectores de transformación. Los vectores de transformación normalmente comprenden un marcador de selección que puede mantenerse bien en un replicón o desarrollarse en un vector de integración, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de expresión y transformación, ya sean replicones extracromosómicos o vectores de integración, se
45 han desarrollado para la transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* [Palva y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79: 5582; documentos EP-A-0 036 259 y EPA-0 063 953; documento WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake y col. (1981) *Nature* 292: 128; Amann y col. (1985) *Gene* 40: 183; Studier y col. (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113; documentos EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 y EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell y col. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655]; *Streptococcus lividans* [Powell y col. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655], *Streptomyces lividans* [Patente de Estados Unidos Nº 4.745.056].

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos son bien conocidos en la técnica y normalmente incluyen cualquiera de las transformaciones de las bacterias tratadas con CaCl₂, u otros agentes, tales
55 como cationes divalentes y DMSO. El ADN también puede introducirse en las células bacterianas por electroporación. Los procedimientos de transformación normalmente varían con la especie bacteriana a transformar. Véase, por ejemplo, [Masson y col. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 273; Palva y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79: 5582; documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; documento WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 856; Wang y col. (1990) *J. Bacteriol.* 172: 949, *Campylobacter*], [Cohen y col. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2110; Dower y col. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In *Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering* (eds. H.W. Boyer y S. Nicosia); Mandel y col. (1970) *J. Mol. Biol.* 53: 159; Taketo (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949: 318; *Escherichia*], [Chassy y col. (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler y col. (1988) *Anal. Biochem.* 170: 38, *Pseudomonas*]; [Augustin y col. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 203, *Staphylococcus*], [Barany y col. (1980) *J. Bacteriol.* 144: 698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, en: *Streptococcal Genetics* (ed. J. Ferretti y R.

Curtiss III); Perry y col. (1981) *Infect. Immun.* 32: 1295; Powell y col. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655; Somkuti y col. (1987) *Proc. 4^a Evr. Cong. Biotechnology* 1: 412, *Streptococcus*].

v. Expresión en levaduras

los sistemas de expresión en levaduras son también conocidos por los expertos habituales en la técnica. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción normalmente situada próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión de la ARN polimerasa (la "Caja TATA") y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de levadura puede tener también un segundo dominio denominado secuencia activadora cadena arriba (UAS, *Upstream Activator Sequence*), que, si está presente, es normalmente distal al gen estructural. La UAS permite la expresión regulada (inducible). La expresión constitutiva se produce en ausencia de UAS. La expresión regulada puede ser tanto positiva como negativa, mejorando o reduciendo por lo tanto la transcripción.

La levadura es un organismo fermentador con una ruta metabólica activa, por tanto las secuencias que codifican enzimas de la ruta metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluyen alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP-A-0 284 044), enolasa, glucoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH), hexoquinasa, fosfofructoquinasa, 3-fosfoglicerato mutasa y piruvato quinasa (PiK) (documento EPO-A-0 329 203). El gen de levadura *PH05*, que codifica la fosfatasa ácida, también proporciona secuencias promotoras útiles [Myanohara y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1].

Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también actúan como promotores de levadura. Por ejemplo, las secuencias UAS de un promotor de levadura pueden unirse con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor híbrido sintético. Los ejemplos de dichos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora ADH unida a la región de activación de la transcripción GAP (Patentes de Estados Unidos N° 4.876.197 y 4.880.734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que contienen las secuencias reguladoras de los genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10* o *PH05*, combinados con la región de activación de la transcripción de un gen de enzima glucolítica tal como GAP o PiK (documento EP-A-0 164 556). Además, un promotor de levadura puede incluir promotores de aparición natural de origen no levadura que tienen la capacidad de unirse con la ARN polimerasa de la levadura e iniciar la transcripción. Entre los ejemplos de dichos promotores se incluyen, entre otros, [Cohen y col. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1078; Henikoff y col. (1981) *Nature* 283: 835; Hollenberg y col. (1981) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 119; Hollenberg y col. (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," en: *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance* (eds. K.N. Timmis y A. Puhler); Mercerau-Puigalon y col. (1980) *Gene* 11: 163; Panthier y col. (1980) *Curr. Genet.* 2:109;].

Una molécula de ADN puede expresarse intracelularmente en una levadura. Una secuencia promotora puede unirse directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N de la proteína recombinante será siempre una metionina, codificada por un codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina del extremo N puede escindirse de la proteína incubando *in vitro* con bromuro de cianógeno.

Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a los sistemas de expresión en levaduras, así como en sistemas de expresión en mamífero, baculovirus y bacterianos. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la parte N-terminal de una proteína endógena de levadura, u otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de las secuencias codificantes heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la superóxido dismutasa (SOD) de levadura o de ser humano puede unirse al extremo 5' de un gen extraño y expresarlo en la levadura. La secuencia de ADN en el sitio de unión de las dos secuencias de aminoácidos puede codificar o no un sitio de escisión. Véase, por ejemplo, el documento EP-A-0 196 056. Otro ejemplo es una proteína de fusión ubiquitina. Dicha proteína de fusión se fabrica con la región ubiquitina que conserva preferentemente un sitio de procesamiento de enzima (por ejemplo, proteasa de procesamiento específica de la ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. Por tanto, mediante este procedimiento pueden aislarse proteínas nativas extrañas (por ejemplo, documento WO 88/024066).

Como alternativa, las proteínas extrañas pueden secretarse desde la célula en el medio de cultivo creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en la levadura. Preferentemente, existen sitios de procesamiento, codificados entre el fragmento de secuencia líder y el gen extraño que pueden escindirse tanto *in vivo* como *in vitro*. El fragmento de secuencia líder codifica normalmente un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivar de genes de proteínas de levadura secretadas tales como el gen de invertasa de la levadura (documentos EP-A-0 012 873; JPO. 62.096.086) y el gen del factor A (Patente de Estados Unidos N° 4.588.684). Como alternativa, hay líderes de origen no levadura, tal como un líder de

interferón, que también proporcionan la secreción en la levadura (documento EP-A-0 060 057).

Una clase preferida de líderes de secreción es aquella que emplea un fragmento del gen del factor alfa de levadura, que contiene tanto una secuencia "pre-señal" como una región "pro". Los tipos de fragmentos del gen del factor alfa que pueden emplearse incluyen la secuencia líder factor pre-pro alfa de longitud completa (de aproximadamente 83 restos de aminoácidos) así como secuencias líder de factor alfa truncadas (normalmente entre aproximadamente 25 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos) (Patentes de Estados Unidos N° 4.546.083 y 4.870.008; documento EP-A-0 324 274). Otras secuencias líder que emplean un fragmento líder del factor alfa que proporcionan secreción incluyen los líderes del factor alfa híbridos que se fabrican con una presecuencia de una primera levadura, pero con una pro-región procedente de un segundo factor alfa de levadura (véase, por ejemplo, el documento WO 89/02463). Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por las levaduras son las regiones reguladoras localizadas en el extremo 3' con respecto al codón de terminación de la traducción, y por tanto, junto con el promotor, flanquean la secuencia codificante. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede traducirse en el polipéptido codificado por el ADN. Son ejemplos de secuencia de terminación de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por levaduras, las que codifican enzimas glucolíticas. Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, líder (si se desea), una secuencia codificante de interés y una secuencia de terminación de la transcripción, se colocan juntas en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaces de mantenerse establemente en un huésped, tal como una levadura o una bacteria. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que le permite permanecer, por ejemplo, en una levadura para la expresión y en un huésped de procarionota tanto para la clonación como para la amplificación. Entre los ejemplos de estos vectores lanzadera levadura-bacteria se incluyen YEp24 [Botstein y col. (1979) *Gene* 8: 17-24], pCI/1 [Brake y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642-4646], e YRp17 [Stinchcomb y col. (1982) *J. Mol. Biol.* 158: 157]. Además, un replicón puede ser un plásmido con número de copias tanto alto como bajo. Un plásmido con número de copias alto generalmente tendrá un número de copias que varía entre aproximadamente 5 a aproximadamente 200, y normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contenga un plásmido con número de copias alto contendrá preferentemente al menos aproximadamente 10, y más preferentemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. La introducción de un vector con un número de copias alto o bajo puede seleccionarse, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña en el huésped. Véase, *por ejemplo*, Brake y col., citado anteriormente.

Como alternativa, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma de la levadura con un vector integrante. Los vectores integrantes normalmente contienen al menos una secuencia homóloga respecto a un cromosoma de levadura que permite que el vector se integre, y preferentemente contiene dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogos en el vector y en el cromosoma de la levadura [Orr-Weaver y col. (1983) *Methods in Enzymol.* 101: 228-245]. Un vector integrante puede dirigirse a un locus específico de la levadura seleccionando la secuencia homóloga apropiada para su inclusión en el vector. Véase, Orr-Weaver y col., citado anteriormente. Puede integrarse una o más construcciones de expresión, influyendo posiblemente en los niveles de proteína recombinante producidos [Rine y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6750]. Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector pueden presentarse como un único segmento en el vector, que da como resultado la integración del vector completo, o dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma y que flanquean la construcción de expresión en el vector, lo que puede dar como resultado la integración estable de únicamente la construcción de expresión.

Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas e integrantes pueden contener marcadores de selección que permiten la selección de cepas de levadura que se han transformado. Los marcadores de selección pueden incluir genes biosintéticos que pueden expresarse en el huésped de levadura tales como *ADE2*, *HIS4*, *LEU2*, *TRP1* y *ALG7*, así como genes de resistencia G418, que confieren resistencia a las células de levadura a la tunicamicina y G418, respectivamente. Además, un marcador de selección adecuado también puede proporcionar levaduras con la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos, tal como un metal. Por ejemplo, la presencia de *CUP1* permite que la levadura crezca en presencia de iones cobre [Butt y col. (1987) *Microbiol. Rev.* 51: 351].

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

Los vectores de expresión y transformación, ya sean replicones extracromosómicos o vectores de integración, se han desarrollado para transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes levaduras: *Candida albicans* [Kurtz, y col. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 142], *Candida maltosa* [Kunze, y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25: 141], *Hansenula polymorpha* [Gleeson, y col. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459; Roggenkamp y col. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202: 302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, y col. (1984) *J. Bacteriol.* 158: 1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt y col. (1983) *J. Bacteriol.* 154: 737; Van den Berg y col. (1990) *Bio/Technology* 8: 135], *Pichia guilliermondii* [Kunze y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25: 141], *Pichia pastoris* [Cregg, y col. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376; Patentes de Estados Unidos N° 4.837.148 y 4.929.555],

Saccharomyces cerevisiae [Hinnen y col. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929; Ito y col. (1983) J. Bacteriol. 153: 163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach y Nurse (1981) Nature 300: 706] y *Yarrowia lipolytica* [Davidow, y col. (1985) Curr. Genet. 10: 380471 Gaillardin, y col. (1985) Curr. Genet. 10: 49].

5 En la técnica se conocen bien procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes de levadura, y normalmente incluyen la transformación de esferoplastos o de células de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Los procedimientos de transformación normalmente varían con la especie de levadura que va a transformarse. Véase, por ejemplo: [Kurtz y col. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 142; Kunze y col. (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141; *Candida*]; [Gleeson y col. (1986) J. Gen. Microbiol. 132: 3459; Roggenkamp y col. (1986) Mol. Gen. Genet. 10
202: 302; *Hansenula*]; [Das y col. (1984) J. Bacteriol. 158: 1165; De Louvencourt y col. (1983) J. Bacteriol. 154: 1165; Van den Berg y col. (1990) Bio/Technology 8: 135; *Kluyveromyces*]; [Cregg y col. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376; Kunze y col. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; Patentes de Estados Unidos N° 4.837.148 y 4.929.555; *Pichia*]; [Hinnen y col. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito y col. (1983) J. Bacteriol. 153: 163 *Saccharomyces*]; [Beach y Nurse (1981) Nature 300: 706; *Schizosaccharomyces*]; [Davidow y col. (1985) Curr. Genet. 10: 39; Gaillardin y col. (1985) Curr. Genet. 10:49; *Yarrowia*].

Anticuerpos

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o a un grupo de polipéptidos compuesto al menos por un sitio de combinación de anticuerpo. Un "sitio de combinación de anticuerpo" es un espacio de unión tridimensional con una forma de superficie interna y una distribución de carga complementaria a las características de un epítipo de un antígeno, que permite la unión de un anticuerpo con el antígeno. Un "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos de vertebrados, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos modificados, anticuerpos univalentes, proteínas Fab y anticuerpos de dominio único.

Los anticuerpos contra las proteínas de la invención son útiles para cromatografía de afinidad, inmunoensayos y diferenciar/identificar proteínas de Neisseria.

30 Los anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, contra las proteínas de la invención, pueden prepararse mediante procedimientos convencionales. En general, la proteína se usa primero para inmunizar un animal adecuado, preferentemente un ratón, rata, conejo o cabra. Los conejos y las cabras se prefieren para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero que puede obtenerse y a la disponibilidad de anticuerpos marcados anti-cabra y anti-conejo. La inmunización se realiza generalmente mezclando o emulsionando la proteína en suero salino, preferentemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o por vía intramuscular). Una dosis de 50-200 µg/inyección suele ser suficiente. La inmunización se estimula generalmente 2-6 semanas después con una o más inyecciones de proteína en suero salino, preferentemente usando adyuvante incompleto de Freund. Como alternativa, pueden generarse anticuerpos por inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, que a efectos de la presente invención, se consideran equivalentes a la inmunización *in vivo*. El antisuero policlonal se obtiene extrayendo sangre del animal inmunizado a un recipiente de vidrio o de plástico, incubando la sangre a 25 °C durante una hora, seguido de incubación a 4 °C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, 1.000 g durante 10 minutos). Aproximadamente, en los conejos pueden obtenerse 20-50 ml por extracción de sangre.

45 Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el procedimiento convencional de Kohler y Milstein [*Nature* (1975) 256: 495-96], o una modificación del mismo. Típicamente, se inmuniza un ratón o una rata como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en lugar de sangrar al animal para extraer el suero, se extirpa el bazo (y opcionalmente algunos ganglios linfáticos principales) y se disocia en células sencillas. Si se desea, los esplenocitos pueden separarse (tras la retirada de células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo revestido con el antígeno de la proteína. Las células B que expresan la inmunoglobulina unida con la membrana específicas del antígeno se unen a la placa, y no se eliminan por aclarado con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todos los esplenocitos disociados, se introducen después para fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, medio de timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se colocan en placas con dilución limitada y se someten a ensayo respecto de la producción de anticuerpos que se unen específicamente con el agente inmunizante (y que no se unen con antígenos no relacionados). Los hibridomas que segregan MAb seleccionados se cultivan después *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o en reactores de fibra hueca), o *in vivo* (como ascites en ratones).

60 Si se desea, los anticuerpos (tanto policlonales como monoclonales) pueden marcarse usando técnicas convencionales. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente ³²P y ¹²⁵I), reactivos con densidad electrónica, enzimas, y ligandos que tengan compañeros de unión específicos. Las enzimas se detectan típicamente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante normalmente se usa para detectar su capacidad para convertir la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. El "compañero de unión específico" se refiere a una proteína capaz de unir

una molécula ligando con alta especificidad, como por ejemplo, en el caso de un antígeno y el anticuerpo monoclonal específico del mismo. Otros compañeros de unión específicos incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas receptor-ligando conocidas en la técnica. Debe entenderse que la descripción anterior no intenta clasificar los diversos marcadores en distintas clases, ya que el mismo marcador puede actuar de diferentes modos. Por ejemplo, el ^{125}I puede usarse como un marcador radioactivo o como un reactivo con densidad electrónica. La HRP puede actuar como una enzima o como un antígeno de un MAb. Adicionalmente, pueden combinarse diversos marcadores para conseguir un efecto deseado. Por ejemplo, los MAb y la avidina pueden requerir marcadores en la realización práctica de la presente invención: por tanto, puede marcarse un MAb con biotina y detectar su presencia con avidina marcada con ^{125}I , o con un MAb anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos habituales en la técnica, y se consideran como equivalentes en el alcance de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender tanto polipéptidos como ácidos nucleicos de la invención. Las composiciones farmacéuticas comprenderán una cantidad terapéuticamente eficaz tanto de polipéptidos como de polinucleótidos de la invención reivindicada.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. El efecto puede detectarse, por ejemplo, mediante marcadores químicos o niveles de antígeno. Los efectos terapéuticos también incluyen la reducción de los síntomas físicos, tal como la disminución de la temperatura corporal. La cantidad eficaz exacta para un sujeto dependerá de la estatura y salud del sujeto, de la naturaleza y grado de la afección y de los compuestos terapéuticos o combinación de los compuestos terapéuticos seleccionados para la administración. Por tanto, no es útil especificar una cantidad eficaz exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación determinada puede determinarse por experimentación rutinaria y queda a juicio del médico tratante.

Para los objetivos de la presente invención, una dosis eficaz estará comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/kg a 50 mg/kg o entre 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las construcciones de ADN en el individuo al cual se administran.

Una composición farmacéutica puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tales como anticuerpos o un polipéptido, genes u otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que, por sí mismo, no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales al individuo que recibe la composición, y que pueda administrarse sin toxicidad prevista. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, aminoácidos copoliméricos y partículas virales inactivas. Dichos vehículos son muy conocidos por los expertos habituales en la técnica.

En el presente documento pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Un amplio análisis sobre los excipientes farmacéuticamente aceptables se encuentra en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991). Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, en dichos vehículos, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampón de pH y similares. Típicamente, las composiciones terapéuticas se preparan en forma de inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas se incluyen en la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Procedimientos de administración

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, pueden ser tratados sujetos humanos.

La administración directa de las composiciones se realizará generalmente mediante inyección, ya sea por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (véase, por ejemplo, el documento WO 98/20734), agujas y pistolas génicas o hipopulverizadores. La dosificación del tratamiento puede ser un régimen de dosis simple o un régimen de dosis múltiple.

Vacunas

Las vacunas de acuerdo con la descripción pueden ser tanto profilácticas (es decir, para prevenir la infección) como terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad después de la infección).

Dichas vacunas comprenden un antígeno (o antígenos) inmunizante, un inmunógeno (o inmunógenos), un polipéptido (o polipéptidos), una proteína (o proteínas) o ácido nucleico, normalmente en combinación con "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, aminoácidos copoliméricos, agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas virales inactivas. Dichos vehículos son muy conocidos por los expertos habituales en la técnica. Adicionalmente, estos vehículos pueden actuar como agentes inmunoestimuladores ("adyuvantes"). Adicionalmente, el antígeno o inmunógeno puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de los patógenos difteria, tétanos, cólera, *H. pylori*, etc.

Los adyuvantes preferidos para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana, tales como, por ejemplo: (a) MF59™ (documento WO 90/14837; capítulo 10 en *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995), que contiene escaleno al 5%, Owen 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (conteniendo opcionalmente diferentes cantidades de MTP-PE (véase más adelante), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como un microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualano al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 plurónico bloqueado al 5% y thr-MDP (véase más adelante) tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como sometido a agitación vorticial para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande y (c) sistema de adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualano al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforolípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (3) pueden usarse adyuvantes de saponina tales como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores); (4) Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo gamma interferón), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc; y (6) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para mejorar la eficacia de la composición. Se prefieren el alumbre y el MF59™.

Como se ha mencionado anteriormente, los muramil péptidos incluyen, pero sin limitación, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, el antígeno inmunizante/inmunógeno/polipéptido/proteína/ácido nucleico, vehículo farmacéuticamente aceptable y adyuvante) contendrán típicamente diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Además, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares.

Típicamente, las composiciones inmunogénicas se preparan en forma de inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para ponerlas en solución, o en suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para un mejor efecto adyuvante, como se ha mencionado anteriormente en el apartado de vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de los polipéptidos antigénicos o inmunogénicos, así como cualquier otro de los componentes anteriormente mencionados, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, tanto en una sola dosis sencilla o como parte de una serie, es eficaz en el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo que vaya a tratarse, del grupo taxonómico del individuo que vaya a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación de la situación médica por el doctor tratante y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre dentro de un intervalo relativamente amplio, que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

Las composiciones inmunogénicas se administran convenientemente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección, por vía subcutánea o intramuscular transdérmica/transcutánea (véase, por ejemplo, el documento WO 98/20734). Otras formulaciones adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones para administración por vía oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas. La dosificación del tratamiento

puede ser una pauta posológica de una sola dosis o de múltiples dosis. La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

- 5 Como alternativa a las vacunas basadas en proteínas, puede emplearse la vacunación con ADN [por ejemplo, Robinson y Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9: 271-283; Donnelly y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15: 617-648; véase más adelante en el presente documento].

Vehículos de administración de genes

- 10 Los vehículos de terapia génica para la administración de construcciones que incluyen una secuencia codificante de un agente terapéutico de la invención, para administrar a un mamífero para la expresión en el mismo, pueden administrarse tanto por vía local como sistémica. Estas construcciones pueden utilizar estrategias de vectores virales o no virales en una modalidad *in vivo* o *ex vivo*. La expresión de dicha secuencia codificante puede inducirse usando promotores endógenos de mamífero o heterólogos. La expresión de dicha secuencia codificante *in vivo* puede ser
15 constitutiva o regulada.

- La invención incluye vehículos de administración de genes capaces de expresar las secuencias de ácido nucleico contempladas. El vehículo de administración de genes es preferentemente un vector viral y, más preferentemente, un vector retroviral, adenoviral, adeno-asociado viral (AAV), herpes viral o alfavirus. El vector viral también puede ser un vector viral de astrovirus, coronavirus, ortomuixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus o togavirus. Véase, en líneas generales, Jolly (1994) *Cancer Gene Therapy* 1: 51-64; Kimura (1994) *Human Gene Therapy* 5: 845-852; Connelly (1995) *Human Gene Therapy* 6: 185-193; y Kaplitt (1994) *Nature Genetics* 6: 148-153.

- 25 Los vectores retrovirales son bien conocidos en la técnica y se contempla que, en la presente invención, puede usarse cualquier vector retroviral para terapia génica, incluyendo retrovirus de los tipos B, C y D, retrovirus xenotrópicos (por ejemplo, NZB-X1, NZBX2 y NZB9-1 (véase O'Neill (1985) *J. Virol.* 53: 160) retrovirus politrópicos por ejemplo MCF y MCF-MLV (véase Kelly (1983) *J. Virol.* 45: 291), espumavirus y lentivirus. Véase RNA Tumor Viruses, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.

- 30 Las partes del vector para terapia génica retroviral pueden derivar de diferentes retrovirus. Por ejemplo, los retrovectores LTR pueden derivar de un Virus de Sarcoma Murino, de un sitio de unión a ARNt de un Virus de Sarcoma de Rous, de una señal de empaquetamiento de un Virus de Leucemia Murina, y de un origen de síntesis de una segunda cadena de un Virus de la Leucosis Aviar.

- 35 Estos vectores retrovirales recombinantes pueden usarse para generar partículas de vectores retrovirales competentes en la transducción introduciéndolas en líneas celulares de empaquetamiento adecuadas (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.591.624). Los vectores retrovirales pueden reconstruirse para la integración específica de sitio en el ADN de una célula huésped incorporando una enzima integrasa quimérica en la partícula retroviral (véase el documento WO 96/37626). Es preferible que el vector viral recombinante sea un virus recombinante con defectos en la replicación.

- 45 Las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para su uso en los vectores retrovirales descritos anteriormente son bien conocidas en la técnica, se preparan fácilmente (véanse los documentos WO 95/30763 y WO 92/05266), y pueden usarse para producir líneas celulares (denominadas también líneas celulares vectoriales o "LCV") para la producción de partículas vectoriales recombinantes. Preferentemente, las líneas celulares de empaquetamiento se fabrican a partir de células parentales humanas (por ejemplo, células HT1080) o de líneas celulares parentales de visón, lo que elimina la inactivación en suero humano.

- 50 Los retrovirus preferidos para la construcción de vectores retrovirales para terapia génica incluyen el Virus de Leucosis Aviar, el Virus de la Leucemia Bovina, el Virus de la Leucemia Murina, el Virus Inductor de Focos Celulares en el Visón, el Virus del Sarcoma Murino, el Virus de la Reticuloendoteliosis y el Virus del Sarcoma de Rous. Se prefieren particularmente los Virus de la Leucemia Murina que incluyen 4070A y 1504A (Hartley y Rowe (1976) *J Virol* 19: 19-25), Abelson (ATCC N° VR-999), Friend (ATCC N° VR-245), Graffi, Gross (ATCC N° VR-590), Kirsten, Virus del Sarcoma de Harvey y Rauscher (ATCC N° VR-998) y Virus de la Leucemia Murina de Moloney (ATCC N° VR-190). Dichos retrovirus pueden obtenerse de depósitos o colecciones tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") en Rockville, Maryland, o aislarse de fuentes conocidas usando técnicas normalmente disponibles.

- 60 Los vectores retrovirales conocidos ejemplares para terapia génica que pueden emplearse en la presente invención incluyen los descritos en las Solicitudes de Patente GB2200651, EP0415731, EP0345242, EP0334301, WO89/02468; WO89/05349, WO89/09271, WO90/02806, WO90/07936, WO94/03622, WO93/25698, WO93/25234, WO93/11230, WO93/10218, WO91/02805, WO91/02825, WO95/07994, US 5.219.740, US 4.405.712, US 4.861.719, US 4.980.289, US 4.777.127, US 5.591.624. Véase también Vile (1993) *Cancer Res* 53: 3860-3864; Vile (1993) *Cancer Res* 53: 962-967; Ram (1993) *Cancer Res* 53 (1993) 83-88; Takamiya (1992) *J Neurosci Res* 33: 493-503; Baba (1993) *J Neurosurg* 79: 729-735; Mann (1983) *Cell* 33: 153; Cane (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81: 6349; y
65

Miller (1990) *Human Gene Therapy* 1.

Los vectores adenovirales para terapia génica humana también se conocen en la técnica y pueden emplearse en la presente invención. Véase, por ejemplo, Berkner (1988) *Biotechniques* 6: 616 y Rosenfeld (1991) *Science* 252: 431, y los documentos WO93/07283, WO93/06223 y WO93/07282. Los vectores adenovirales para terapia génica ejemplares conocidos que pueden emplearse en la presente invención incluyen los descritos en los documentos indicados anteriormente y en los documentos WO94/12649, WO93/03769, WO93/191, WO94/28938, WO95/11984, WO95/00655, WO95/27071, WO95/29993, WO95/34671, WO96/05320, WO94/08026, WO94/11506, WO93/06223, WO94/24299, WO95/14102, WO95/24297, WO95/02697, WO94/28152, WO94/24299, WO95/09241, WO95/25807, WO95/05835, WO94/18922 y WO95/09654. Como alternativa, puede emplearse la administración de ADN ligado a adenovirus destruidos, tal como describe Curiel (1992) en *Hum. Gene Ther.* 3: 147-154. Los vehículos para la administración de los genes de la invención también incluyen vectores de virus adenoasociados (AAV). Los ejemplos principales y preferidos de este tipo de vectores para su uso en la presente invención son los vectores basados en AAV-2 desvelados en Srivastava, documento WO93/09239. Los vectores AAV más preferidos comprenden las dos repeticiones terminales invertidas AAV en las que las secuencias D nativas se modifican mediante la sustitución de nucleótidos, tales como al menos 5 nucleótidos nativos y hasta 18 nucleótidos nativos, preferentemente al menos 10 nucleótidos nativos hasta 18 nucleótidos nativos, más preferentemente se conservan 10 nucleótidos nativos y el resto de nucleótidos de la secuencia D se delecionan o se sustituyen con nucleótidos no nativos. Las secuencias D nativas de las repeticiones terminales AAV invertidas son secuencias de 20 nucleótidos consecutivos en cada repetición terminal AAV invertida (es decir, hay una secuencia en cada extremo) que no está implicada en la formación de HP. El nucleótido no nativo de sustitución puede ser cualquier nucleótido distinto del nucleótido que se encuentra en la secuencia D nativa en la misma posición. También pueden emplearse otros vectores AAV ejemplares como pWP-19, pWN-1, ambos desvelados en Nahreini (1993) *Gene* 124: 257-262. Otro ejemplo de este tipo de vector AAV es psub201 (véase Samulski (1987) *J. Virol.* 61: 3096). Otro vector AAV ejemplar es el vector ITR Doble D. La construcción del vector ITR Doble D se desvela en la Patente de Estados Unidos 5.478.745. Otros vectores adicionales son los que desvela Carter en la Patente de Estados Unidos nº 4.797.368 y Muzyczka en la Patente de Estados Unidos de nº 5.139.941, Chartejee en la Patente de Estados Unidos nº 5.474.935 y Kotin en el documento WO94/288157. Otro ejemplo adicional de un vector AAV que puede emplearse en la presente invención es el SSV9AFABTKneo, que contiene el mejorador AFP y un promotor de albúmina y dirige la expresión predominantemente en el hígado. Su estructura y construcción se desvela en Su (1996) *Human Gene Therapy* 7: 463-470. Otros vectores AAV para terapia génica se describen en los documentos US 5.354.678, US 5.173.414, US 5.139.941 y US 5.252.479.

Los vectores para terapia génica de la invención también incluyen los vectores del herpes. Los ejemplos principales y preferidos son los vectores del virus del herpes simple que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de la timidina quinasa como el que se describe en los documentos US 5.288.641 y EP0176170 (Roizman). Ejemplos adicionales de vectores del virus del herpes simple incluyen HFEM/ICP6-LacZ desvelado en el documento WO95/04139 (Wistar Institute), pHSVlac descrito en Geller (1988) *Science* 241: 1667-1669 y en los documentos WO90/09441 y WO92/07945, HSV Us3::pgC-lacZ descrito en Fink (1992) *Human Gene Therapy* 3: 11-19 y HSV 7134, 2 RH 105 y GAL4 descritos en el documento EP 0453242 (Breakefield), y los depositados en la ATCC con los números de acceso ATCC VR-977 y ATCC VR-260.

También se contemplan los vectores del virus alfa para terapia génica que pueden también emplearse en la presente invención. Los vectores del virus alfa preferidos son los vectores del virus Sindbis, Togavirus, virus del Bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Middleberg (ATCC VR-370), virus del Río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246), virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532) y los descritos en las Patentes de Estados Unidos 5.091.309, 5.217.879 y WO92/10578. Más particularmente, pueden emplearse los vectores del virus alfa descritos en la patente con Nº de Serie de Estados Unidos 08/405.627, presentada el 15 de marzo de 1995, y los documentos WO94/21792, WO92/10578, WO95/07994, US 5.091.309 y US 5.217.879. Dichos virus alfa pueden obtenerse a partir de depósitos o colecciones tales como la ATCC en Rockville, Maryland o aislarse a partir de fuentes conocidas usando técnicas comúnmente disponibles. Preferentemente, se usan los vectores del virus alfa con citotoxicidad reducida (véase el documento USSN 08/679640).

Los sistemas de vector de ADN tales como los sistemas de expresión basados en eucariotas también son útiles para expresar los ácidos nucleicos de la invención. Véase el documento WO95/07994 para una descripción detallada de los sistemas de expresión basados en eucariotas. Preferentemente, los sistemas de expresión basados en eucariotas de la invención derivan de vectores del virus alfa y más preferentemente de vectores virales Sindbis.

Otros vectores virales adecuados para su uso en la presente invención incluyen los derivados del poliovirus, por ejemplo ATCC VR-58 y los descritos en Evans, *Nature* 339 (1989) 385 y Sabin (1973) *J. Biol. Standardization* 1: 115; rinovirus, por ejemplo ATCC VR-1110 y los descritos en Arnold (1990) *J Cell Biochem* L401; virus de la viruela tales como el virus de la viruela del canario o el virus de la vacuna, por ejemplo ATCC VR-111 y ATCC VR-2010 y los descritos en Fisher-Hoch (1989) *Proc Natl Acad Sci* 86: 317; Flexner (1989) *Ann NY Acad Sci* 569: 86; Flexner (1990) *Vaccine* 8: 17; en los documentos US 4.603.112 y US 4.769.330 y WO89/01973; virus SV40, por ejemplo ATCC VR-305 y los descritos en Mulligan (1979) *Nature* 277: 108 y Madzak (1992) *J Gen Virol* 73: 1533; virus de la

gripe, por ejemplo ATCC VR-797 y virus de la gripe recombinante fabricados por técnicas de ingeniería genética inversa como se describe en el documento US 5.166.057 y en Enami (1990) *Proc Natl Acad Sci* 87: 3802-3805; Enami y Palese (1991) *J Virol* 65: 2711-2713 y Luytjes (1989) *Cell* 59: 110, (véase también McMichael (1983) *NEJ Med* 309: 13 y Yap (1978) *Nature* 273: 238 y *Nature* (1979) 277: 108); virus de la inmunodeficiencia humana como se describe en el documento EP-0386882 y en Buchschacher (1992) *J. Virol.* 66: 2731; virus del sarampión, por ejemplo ATCC VR-67 y VR-1247 y los descritos en el documento EP-0440219; virus Aura, por ejemplo ATCC VR-368; virus Bebaru, por ejemplo ATCC VR-600 y ATCC VR-1240; virus Cabassou, por ejemplo ATCC VR-922; virus Chikungunya, por ejemplo ATCC VR-64 y ATCC VR-1241; Virus Fort Morgan, por ejemplo ATCC VR-924; virus Getah, por ejemplo ATCC VR-369 y ATCC VR-1243; virus Kyzylagach, por ejemplo ATCC VR-927; virus Mayaro, por ejemplo ATCC VR-66; virus Mucambo, por ejemplo ATCC VR-580 y ATCC VR-1244; virus Ndumu, por ejemplo ATCC VR-371; virus Pixuna, por ejemplo ATCC VR-372 y ATCC VR-1245; virus Tonate, por ejemplo ATCC VR-925; Trinit virus, por ejemplo ATCC VR-469; Una virus, por ejemplo ATCC VR-374; Whataroa virus, por ejemplo ATCC VR-926; virus Y-62-33, por ejemplo ATCC VR-375; O'Nyong virus, virus de la encefalitis oriental, por ejemplo, por ejemplo ATCC VR-65 y ATCC VR-1242; virus de la encefalitis occidental, por ejemplo ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622 y ATCC VR-1252; y coronavirus, por ejemplo ATCC VR-740 y los descritos en Hamre (1966) *Proc Soc Exp Biol Med* 121: 190.

La administración de las composiciones de la presente invención en las células no está limitada a los vectores virales anteriormente mencionados. Pueden emplearse otros procedimientos y medios de administración tales como, por ejemplo, vectores de expresión de ácidos nucleicos, ADN policatiónico condensado ligado o no ligado a adenovirus destruidos en solitario, véase, por ejemplo, el documento con N° de Serie de Estados Unidos 08/366.787, presentado el 30 de diciembre 1994 y Curiel (1992) *Hum Gene Ther* 3: 147-154 ligand linked DNA, por ejemplo véase Wu (1989) *J Biol Chem* 264: 16985-16987, vehículos celulares de administración de células eucariotas, véase, por ejemplo, el documento de Estados Unidos con N° de Serie 08/240.030, presentado el 9 de mayo de 1994 y el documento de Estados Unidos con N° de Serie 08/404.796, deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados, pistola manual de partículas para transferencia de genes, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.149.655, radiación ionizante como se describe en el documento US 5.206.152 y en WO92/11033, neutralización de carga de núcleo o fusión con membranas celulares. Otras estrategias se describen en Philip (1994) *Mol Cell Biol* 14: 2411-2418 y en Woffendin (1994) *Proc Natl Acad Sci* 91: 1581-1585.

Puede emplearse transferencia de genes mediada por partículas, véase, por ejemplo, el documento de Estados Unidos con N° de Serie 60/023.867. Resumiendo, la secuencia puede insertarse en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para una expresión de alto nivel, y después incubarse con moléculas de transferencia de genes sintéticos tal como cationes de unión de ADN polimérico como polilisina, protamina y albúmina, unido con ligandos de diana celular tales como asialoorosomucoide, como se describe en Wu y Wu (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432, insulina, como se describe en Hucked (1990) *Biochem Pharmacol* 40: 253-263, galactosa, como se describe en Plank (1992) *Bioconjugate Chem* 3: 533-539, lactosa o transferrina.

También puede emplearse ADN desnudo. Los procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares se describen en los documentos WO 90/11092 y US 5.580.859. La eficacia de la captación puede mejorarse usando perlas de látex biodegradable. Las perlas de látex recubiertas de ADN se transportan eficazmente al interior de las células después de iniciar la endocitosis mediante las perlas. El procedimiento puede mejorarse aún más por tratamiento de las perlas para aumentar la hidrofobicidad y, de esta forma, facilitar la rotura del endosoma y la liberación del ADN en el citoplasma.

Los liposomas pueden actuar como vehículos de administración de genes, como se describe en los documentos US 5.422.120, WO95/13796, WO94/23697, WO91/144 y EP-524.968. Como se describe en el documento USSN. 60/023.867, sobre la administración no viral, las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido pueden insertarse en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para una expresión elevada y después incubarse con moléculas de transferencia de genes sintéticos tales como cationes de unión de ADN polimérico como polilisina, protamina y albúmina, unido a ligandos de diana celular tales como asialoorosomucoide, insulina, galactosa, lactosa o transferrina. Otros sistemas de administración incluyen el uso de liposomas para encapsular el ADN que comprende el gen bajo el control de una diversidad de promotores específicos tisulares o activos ubicuos. Otra administración no viral adecuada para su uso incluye los sistemas de liberación mecánica tal como la hipótesis descrita en Woffendin y col (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(24): 11581-11585. Además, la secuencia codificante y el producto de expresión de esta pueden liberarse mediante deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados. Otros procedimientos convencionales para la administración de genes que pueden usarse para administrar la secuencia codificante incluyen, por ejemplo, el uso de una pistola manual para la transferencia de partículas de gen, como se describe en el documento US 5.149.655; el uso de radiación ionizante para activar el gen transferido, como se describe en los documentos US 5.206.152 y WO92/11033.

Se describen liposomas y vehículos de administración de genes policatiónicos ejemplares en las patentes de Estados Unidos 5.422.120 y 4.762.915; en los documentos WO 95/13796; WO94/23697; y WO91/14445; en EP-0524968; y en Stryer, *Biochemistry*, páginas 236-240 (1975) W.H. Freeman, San Francisco; Szoka (1980) *Biochem Biophys Acta* 600: 1; Bayer (1979) *Biochem Biophys Acta* 550: 464; Rivnay (1987) *Meth Enzymol* 149: 119; Wang (1987)

Proc Natl Acad Sci 84: 7851; Plant (1989) Anal Biochem 176: 420.

Una composición de polinucleótido puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un vehículo de terapia génica, según los términos definidos anteriormente. A efectos de la presente invención, una dosis eficaz estará comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/ kg a 50 mg/kg o entre 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las construcciones de ADN en el individuo al cual se administran.

Procedimientos de administración.

Una vez formuladas, las composiciones de polinucleótidos de la invención pueden administrarse (1) directamente al sujeto; (2) administrarse *ex vivo*, a células derivadas del sujeto; o (3) *in vitro* para la expresión de proteínas recombinantes. Los sujetos a tratar pueden ser mamíferos o aves. Además, pueden tratarse sujetos humanos.

La administración directa de las composiciones se realizará habitualmente mediante inyección, por vía tanto subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administrará en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en el interior de una lesión. Otros procedimientos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (véase por ejemplo el documento WO98/20734), agujas y pistolas génicas o hipopulverizadores. La dosificación del tratamiento puede ser una pauta posológica de una sola dosis o de múltiples dosis.

En la técnica se conocen procedimientos para la administración y reimplantación *ex vivo* de células transformadas en un sujeto y se describen, por ejemplo, en el documento WO93/14778. Los ejemplos de células útiles en aplicaciones *ex vivo* incluyen, por ejemplo, células madre, particularmente células hematopoyéticas, linfáticas, macrófagos, dendríticas o tumorales.

Generalmente, la administración de ácidos nucleicos para aplicaciones *ex vivo* e *in vivo* puede conseguirse mediante los siguientes procedimientos, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polipreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de polinucleótido (o polinucleótidos) en liposomas y microinyección directa de ADN en los núcleos, todos ellos bien conocidos en la técnica.

Composiciones farmacéuticas de polinucleótido y polipéptido

Además de los vehículos y sales farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente, pueden usarse los siguientes agentes con las composiciones de polinucleótido y/o polipéptido.

A. Polipéptidos

Un ejemplo son polipéptidos que incluyen, sin limitación: asioloorosomucoide (ASOR); transferrina; asialoglicoproteínas; anticuerpos; fragmentos de anticuerpo; ferritina; interleucinas; interferones; factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre y eritropoyetina. También pueden usarse antígenos virales, tales como proteínas de la envoltura. Igualmente, proteínas de otros organismos invasores, tales como el péptido 17 de aminoácidos procedente de la proteína de *Plasmodium falciparum* conocido como RII.

B. Hormonas, vitaminas, etc.

Otros grupos que pueden incluirse son, por ejemplo: hormonas, esteroides, andrógenos, estrógenos, hormona tiroidea o vitaminas, ácido fólico.

C. Polialquenos, polisacáridos, etc.

Igualmente puede incluirse el polialquilenglicol entre los polinucleótidos/polipéptidos deseados. En una forma de realización preferida, el polialquilenglicol es polietilenglicol. Además, puede incluirse mono-, di-, o polisacáridos. En una forma de realización preferida de este aspecto, el polisacárido es dextrano o DEAE-dextrano. Del mismo modo, quitosan y poli(láctido-co-glicólido)

D. Lípidos y liposomas

El polinucleótido/polipéptido deseado puede encapsularse también en lípidos o empaquetarse en liposomas antes de administrarlos al sujeto, o a las células derivadas de las anteriores.

La encapsulación en lípidos se realiza generalmente usando liposomas que enlazan o atrapan de forma estable y retienen el ácido nucleico. La relación de polinucleótido condensado con respecto a preparación lipídica puede variar pero generalmente estará comprendida en aproximadamente 1:1 (mg ADN:micromoles de lípido) o más lípido. Para una revisión del uso de liposomas como vehículos para la administración de ácidos nucleicos, véase, Hug y Sleight (1991) Biochim. Biophys. Acta. 1097: 1-17; Straubinger (1983) Meth. Enzymol. 101: 512-527.

Las preparaciones liposomales para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Se ha demostrado que los liposomas catiónicos median la administración intracelular de ADN de plásmido (Felgner (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7416); ARNm (Malone (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6077-6081); y factores de transcripción purificados (Debs (1990) J. Biol. Chem. 265: 10189-10192) en forma funcional.

Los liposomas catiónicos se encuentran fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) se encuentran disponible con el nombre comercial Lipofectin de GIBCO BRL, Grand Island, NY. (Véase también Felgner, citado anteriormente). Otros liposomas disponibles en el mercado incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Otros liposomas catiónicos pueden prepararse a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la técnica véase, por ejemplo, Szoka (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4194-4198; WO90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano).

De manera similar, los liposomas aniónicos y neutros se encuentran fácilmente disponibles, tales como los de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) o pueden prepararse a partir de materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales pueden mezclarse también con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en las relaciones adecuadas. Los procedimientos de producción de liposomas usando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV) o vesículas unilamelares grandes (LUV). Los diferentes complejos liposoma-ácido nucleico se preparan usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Straubinger (1983) Meth. Immunol. 101: 512-527; Szoka (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4194-4198; Papahadjopoulos (1975) Biochim. Biophys. Acta 394: 483; Wilson (1979) Cell 17: 77; Deamer y Bangham (1976) Biochim. Biophys. Acta 443: 629; Ostro (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 836; Fraley (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3348); Enoch y Strittmatter (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 145; Fraley (1980) J. Biol. Chem. (1980) 255: 10431; Szoka y Papahadjopoulos (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 145; y Schaefer-Ridder (1982) Science 215: 166.

E. Lipoproteínas

Además, en el polinucleótido/polipéptido a administrar pueden incluirse lipoproteínas. Entre los ejemplos de lipoproteínas a utilizar se incluyen: quilomicrones, HDL, IDL, LDL y VLDL. También pueden usarse mutantes, fragmentos o fusiones de estas proteínas. Del mismo modo, pueden usarse modificaciones de lipoproteínas de origen natural, tales como LDL acetilado. Estas lipoproteínas pueden dirigir la liberación de polinucleótidos a las células que expresan receptores de lipoproteína. Preferentemente, si con el polinucleótido a administrar se incluyen las lipoproteínas, no se incluye ningún otro ligando o diana en la composición.

Las lipoproteínas de origen natural comprenden una parte lipídica y una parte proteica. La parte proteica se denomina apoproteína. Hasta ahora, se han aislado e identificado las apoproteínas A, B, C, D y E. Al menos dos de estas contienen varias proteínas, denominadas con los numerales romanos AI, AII, AIV; CI, CII, CIII.

Una lipoproteína puede comprender más de una apoproteína. Por ejemplo, los quilomicrones de origen natural comprenden A, B, C y E, con el tiempo, estas proteínas pierden A y adquieren C y E. El VLDL comprende las apoproteínas A, B, C y E, el LDL comprende la apoproteína B; y el HDL comprende las apoproteínas A, C y E.

Los aminoácidos de estas apoproteínas son conocidos y se describen, por ejemplo, en Breslow (1985) Annu Rev. Biochem 54: 699; Law (1986) Adv. Exp Med. Biol. 151: 162; Chen (1986) J Biol Chem 261: 12918; Kane (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77: 2465; y Utermann (1984) Hum Genet 65: 232.

Las lipoproteínas contienen diversos lípidos, incluyendo triglicéridos, colesterol (libre y ésteres) y fosfolípidos. La composición de los lípidos varía en las lipoproteínas de origen natural. Por ejemplo, los quilomicrones de origen natural comprenden principalmente triglicéridos. Una descripción más detallada del contenido en lípidos de las lipoproteínas de origen natural se encuentra, por ejemplo, en Meth. Enzymol. 128 (1986). La composición de lípidos se selecciona para facilitar la conformación de la apoproteína para la actividad de enlace del receptor. La composición de los lípidos puede seleccionarse también para facilitar la interacción hidrófoba y la asociación con la molécula de enlace del polinucleótido.

Las lipoproteínas de origen natural pueden aislarse del suero, por ejemplo, mediante ultra centrifugación. Dichos procedimientos se describen en *Meth. Enzymol.* (citado anteriormente); Pitas (1980) J. Biochem. 255: 5454-5460 y Mahey (1979) J Clin. Invest 64: 743-750. Las lipoproteínas también pueden producirse *in vitro* o mediante procedimientos de recombinación mediante la expresión de los genes de la apoproteína en una célula huésped deseada. Véase, por ejemplo, Atkinson (1986) Annu Rev Biophys Chem 15: 403 y Radding (1958) Biochim Biophys Acta 30: 443. Las lipoproteínas pueden conseguirse también a partir de proveedores comerciales, tales como Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, Estados Unidos. En el documento WO98/06437 puede

encontrarse una descripción adicional de las apoproteínas.

F. Agentes policatiónicos

5 En una composición con el polinucleótido/polipéptido deseado a administrar pueden incluirse agentes policatiónicos, con o sin lipoproteína.
 Los agentes policatiónicos, normalmente, muestran una carga positiva neta a pH fisiológicamente relevante y pueden neutralizar la carga eléctrica de los ácidos nucleicos para facilitar la administración en una localización deseada. Estos agentes tienen aplicaciones tanto *in vitro*, *ex vivo* como *in vivo*. Los agentes policatiónicos pueden usarse para administrar ácidos nucleicos a un sujeto vivo por vía intramuscular, subcutánea, etc.

15 A continuación se indican ejemplos de polipéptidos útiles como agentes policatiónicos: polilisina, poliarginina, poliornitina y protamina. Otros ejemplos incluyen histonas, protaminas, albúmina de suero humano, proteínas de enlace con el ADN, proteínas cromosómicas no histona, proteínas de recubrimiento procedentes de virus de ADN tales como X174, factores transcripcionales que también contienen regiones que se unen al ADN y por tanto pueden ser útiles como agentes de condensación de ácidos nucleicos. Resumiendo, los factores transcripcionales tales como C/CEBP, c-jun, c-fos, AP-1, AP-2, AP-3, CPF, Prot-1, Sp-1, Oct-1, Oct-2, CREP y TFIID contienen regiones básicas que se unen con secuencias de ADN.

20 Los agentes policatiónicos orgánicos incluyen: espermina, espermidina y putrescina.

Las dimensiones y propiedades físicas de un agente policatiónico pueden extrapolarse de la lista anterior para construir otros agentes policatiónicos de polipéptido o producir agentes policatiónicos sintéticos.

25 Los agentes policatiónicos sintéticos que son útiles que incluyen, por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno, Lipofectin™ y lipofectAMINE™, son monómeros que forman complejos policatiónicos cuando se combinan con los polinucleótidos/polipéptidos.

Ensayos de inmunodiagnóstico

30 Los antígenos de Neisseria de la invención pueden usarse en inmunoensayos para detectar niveles de anticuerpo (o, de manera inversa, pueden usarse anticuerpos anti-Neisseria para detectar niveles de antígenos). Pueden desarrollarse inmunoensayos basados en antígenos recombinantes bien definidos para sustituir procedimientos de diagnóstico invasivos. Pueden detectarse anticuerpos frente a proteínas de Neisseria en muestras biológicas incluyendo, por ejemplo, muestras de sangre o suero. El diseño de los inmunoensayos está sometido a un elevado nivel de variación, y una diversidad de estos son bien conocidos en la técnica. Los protocolos de inmunoensayo pueden basarse, por ejemplo, en ensayos de tipo competitivo, o de reacción directa, o de tipo sándwich. Los protocolos también pueden usar, por ejemplo, soportes sólidos o pueden realizarse mediante inmunoprecipitación. La mayor parte de los ensayos implican el uso de anticuerpos o polipéptidos marcados, las etiquetas pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o de tinción. Se conocen también ensayos que amplifican las señales de la sonda; son ejemplos de dichos ensayos los que utilizan biotina y avidina y enzimas marcadas e inmunoensayos mediados, tales como ensayos ELISA.

45 Se construyen kits adecuados para el inmunodiagnóstico y que contienen los reactivos marcados apropiados envasando los materiales adecuados, incluyendo las composiciones, en recipientes adecuados, junto con los reactivos y materiales restantes (por ejemplo, tampones adecuados, soluciones salinas, etc.) necesarios para la realización del ensayo, así como un conjunto adecuado de instrucciones del ensayo.

Hibridación de ácidos nucleicos

50 “Hibridación” se refiere a la asociación de dos secuencias de ácidos nucleicos, estando una secuencia fija a un soporte sólido y la otra libre en solución. A continuación, las dos secuencias se ponen en contacto entre sí en condiciones que favorecen la formación de puentes de hidrógeno. Los factores que afectan a este enlace incluyen; el tipo y volumen del disolvente; la temperatura de la reacción, el tiempo de hibridación, la agitación, agentes que bloquean el enlace no específico de la fase líquida con el soporte sólido (reactivo de Denhardt o BLOTTO); concentración de secuencias; uso de los compuestos para aumentar la velocidad de asociación de las secuencias (sulfato de dextrano o polietilenglicol); y la rigurosidad de las condiciones de lavado tras la hibridación. Véase Sambrook y col. [citado anteriormente] volumen 2, capítulo 9, páginas 9,47 a 9,57.

60 “Rigurosidad” se refiere a las condiciones de la reacción de hibridación que favorecen la asociación de secuencias muy similares sobre las secuencias que se diferencian. Por ejemplo, la combinación de temperatura y concentración de sales debe seleccionarse de manera que esté entre 120 y 200 °C por debajo de la Tm calculada del híbrido sometido a estudio. Las condiciones de temperatura y sal a menudo pueden determinarse de manera empírica en experimentos preliminares en los que las muestras de ADN genómico inmovilizadas sobre filtros se hibridan con la secuencia de interés y después se lavan en condiciones de rigurosidad diferentes. Véase Sambrook et al. En la página 9, 50.

5 Cuando se realiza, por ejemplo, una transferencia de Southern, las variables a tener en cuenta son (1) la complejidad del ADN que se transfiere y (2) la homología entre la sonda y las secuencias a detectar. La cantidad total del fragmento (o fragmentos) a estudiar puede variar en una magnitud de 10, de 0,1 a 1 µg para una digestión de plásmido o fago, de 10⁻⁹ a 10⁻⁸ g para un gen de copia única en un genoma de eucariota muy complejo. Para polinucleótidos de baja complejidad pueden usarse tiempos de transferencia, hibridación y exposición, considerablemente más cortos, una menor cantidad de polinucleótidos de partida y una menor actividad específica de las sondas. Por ejemplo, puede detectarse un gen de levadura de copia única con un tiempo de exposición de solo 1 hora a partir de 1 µg de ADN, transferencia de dos horas e hibridación durante 4-8 horas con una sonda de 10⁸ cpm/µg. Para un gen de mamífero de copia única, se iniciaría una estrategia conservativa con 10 µg de ADN, 10 transferencia durante una noche e hibridación durante una noche con sulfato de dextrano al 10% usando una sonda mayor de 10⁸ cpm/µg, dando como resultado un tiempo de exposición de -24 horas.

15 Varios factores pueden afectar a la temperatura de fusión (*T_m*, *melting Time*) de un híbrido ADN-ADN entre la sonda y el fragmento de interés, y por tanto, las condiciones apropiadas para la hibridación y lavado. En muchos casos, la sonda no es homóloga al 100% con el fragmento. Otras variables normalmente presentes incluyen la longitud y contenido total de G+C de las secuencias hibridantes y la fuerza iónica y contenido en formamida del tampón de hibridación. Los efectos de todos estos factores pueden aproximarse mediante una ecuación sencilla.

$$20 \quad T_m = 81 + 16,6(\log_{10} C_i) + 0,4[\%(G + C)] - 0,6(\text{formamida } \%) - 600/n - 1,5(\% \text{ de no emparejamiento}).$$

20 en la que *C_i* es la concentración salina (iones monovalentes) y *n* es la longitud del híbrido en pares de bases (ligeramente modificado a partir de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284).

25 Para diseñar un experimento de hibridación, deben modificarse de manera conveniente diversos factores que afectan a la hibridación del ácido nucleico. La temperatura de hibridación y lavado y la concentración salina durante los lavados son los más sencillos de ajustar. A medida que aumenta la temperatura de hibridación (es decir, la rigurosidad), la hibridación se produce menos fácilmente entre cadenas que no son homólogas y como resultado, el fondo disminuye. Si la sonda radiomarcada y el fragmento inmovilizado no son completamente homólogos (caso frecuente en experimentos de hibridación en familias de genes y entre especies) la temperatura de hibridación debe reducirse y el fondo disminuirá. La temperatura de los lavados afecta, de manera similar, a la intensidad de la banda de hibridación y al nivel de fondo. La rigurosidad de los lavados aumenta también con la disminución de las concentraciones salinas.

35 En general, las temperaturas de hibridación convenientes en presencia de formamida al 50% son de 42 °C para una sonda con una homología del 95% al 100% con respecto al fragmento diana, de 37 °C para una homología del 90% al 95% y de 32 °C para una homología del 85% al 90%. Para homologías más bajas, el contenido en formamida debe disminuirse y la temperatura debe ajustarse de acuerdo con ello, usando la ecuación anterior. Si no se conoce la homología entre la sonda y el fragmento diana, la estrategia más sencilla es comenzar con condiciones tanto de hibridación como de lavado que no sean rigurosas. Si se observan bandas no específicas, o un fondo elevado tras la auto radiografía, el filtro puede lavarse con una rigurosidad elevada y volver a exponerse. Si el tiempo necesario para la exposición hace que esta estrategia no sea factible, deben ensayarse en paralelo diferentes rigurosidades de hibridación y/o de lavado.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un alineamiento de 287 ejecutado con BOXSHADE. Los aminoácidos conservados tienen un antecedente sólido.

La Figura 2 muestra un árbol filogenético.

La Figura 3 ilustra la variabilidad de la secuencia de aminoácidos en *N. meningitidis* para 287. Estas secuencias se utilizaron para construir el árbol filogenético que se muestra en la Figura 4.

La Figura 5 muestra un alineamiento de 287 ejecutado con BOXSHADE.

EJEMPLOS

55 Ejemplo 1

El Ejemplo 9 del documento WO99 / 57280 describe la clonación y expresión de una proteína de *Neisseria* referida como "287". Se describen la proteína y las secuencias de ADN del serogrupo A y B de *N.meningitidis*, junto con secuencias de *N.gonorrhoeae*.

Se ha secuenciado 287 para una población de referencia de 6 cepas de *Neisseria*:

Número de identificación	Cepa	Referencia
<i>Grupo B</i>		
287_2	BZ198	Seiler <i>et al.</i> (1996)
287_9	NGP165	Seiler <i>et al.</i> (1996)
287_14	NGH38	Seiler <i>et al.</i> (1996)
287_21	MC58	Virji <i>et al.</i> (1992)
<i>Grupo A</i>		
z2491	Z2491	Maiden <i>et al.</i> (1998)
<i>Gonococcus</i>		
fa1090	FA1090	Dempsey <i>et al.</i> (1991)

En la Figura 1 se muestra un alineamiento de las secuencias generadas utilizando PILEUP. Son evidentes los tramos de aminoácidos conservados. Los primeros 42 aminoácidos, por ejemplo, están bien conservados y puede observarse en el extremo C – terminal una región conservada larga.

Las regiones conservadas identificadas en este ejemplo confirman que los fragmentos de la proteína completa 287 son adecuados como vacunas multiespecíficas o reactivos de diagnóstico.

287 volvió a secuenciarse para 35 cepas en total (incluyendo C11, un serogrupo C de la cepa *N.meningitidis*), y se alinearon las secuencias. Los resultados se muestran en la Figura 5.

- GRFAAKVDFGSKSV DGIIDSGDDLHMG
 - QKFKAIDGNGFKGTW TENG GGDVSG(R/K) FYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKDRD

Árbol filogenético

La Figura 2 es un dendograma que muestra la relación genética entre las cepas de *N.meningitidis* 107, basado en el análisis MLST de seis fragmentos génicos [adaptado de Maiden *et al.* (1998) PNAS USA 95: 3140]. El dendograma se puede utilizar para seleccionar cepas representativas del meningococo serogrupo B (flechas). Se superponen en el dendograma y están indicadas con asteriscos cinco cepas adicionales, para las que se ha determinado de manera independiente la asignación genética en linajes hipervirulentos por Wang *et al.* [J.Infect.Dis (1993) 167: 1320], Seiler *et al.* [Mol.Microbiol. (1996) 19: 841], y Virji *et al.* [Mol.Microbiol. (1992) 6: 1271]. Además de las 22 cepas de MenB, se utilizan tres cepas de MenA, dos cepas de MenC y una cepa de cada una de las Men Y, X, Z y W135. Estas se indican con letras en negrita antes del nombre. Cuando no están disponibles los datos del árbol filogenético, las cepas se muestran fuera del árbol. Se indican las cepas hipervirulentas ET – 5, ET – 37 y IV – 1.

Variabilidad secuencial

La Figura 3 es una representación esquemática de la variabilidad de una secuencia de aminoácidos con *N.meningitidis* para las proteínas 225, 235, 287, 519, 919, ORF4 y ORF40. El eje horizontal representa la secuencia de MC58. Se indican las diferencias de los aminoácidos en las cepas MenB mediante las líneas verticales sobre el eje horizontal; se indican las diferencias en los serogrupos A, C, Y, X, Z y W135 mediante líneas bajo el eje. La altura de las líneas verticales representa el número de cepas con diferencias de aminoácidos. Por tanto, los picos muestran regiones variables. Las barras inferiores 225 y 227 representan segmentos secuenciales que se pierden en ciertas cepas.

La Figura 4 es un dendograma de las cepas *N.meningitidis* obtenido utilizando las mismas 7 proteínas. El análisis filogenético basado en estos genes proporcionó un dendograma que agrupa las cepas hipervirulentas de acuerdo con la Figura 2. Las barras indican que las cepas se agrupan con un apoyo bootstrap del 100 % de acuerdo con el análisis MLST. Los números en la base de cada nodo son las puntuaciones bootstrap (se informan solo aquellas > 80 %). Las secuencias génicas de las diferentes cepas se alinean con el programa PILEUP a partir del paquete GCG. El análisis filogenético se realizó utilizando el algoritmo de unión de vecinos [Saitou & Nei (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406] según se implementó en el programa NEIGHBOR del paquete PHYLIP. Se calcularon las distancias por

pares utilizando el método Kimura de dos parámetros [Kimura (1980) J. Mol. Evol. 16: 111] en las 31 cepas de *N.meningitidis*. Se excluyeron la región N – terminal de ORF40, la totalidad de 287, y las repeticiones en tándem de 225 del análisis. Un total de 1000 repeticiones bootstrap permitieron evaluar el nivel de apoyo. La agrupación de las cepas hipervirulentas se confirmó por análisis de máxima parsimonia.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l.

10

<120> ANTÍGENOS *NEISSERIALES* CONSERVADOS

15

<130> P055379EP

<140> EP-__

<141> 2000-04-28

20

<150> GB-0005728.1

<151> 1999-04-30

25

<150> GB-9910168.5

<151> 2000-03-09

30

<150> PCT/IB00/00642

<151> 2000-04-28

35

<150> EP-00922818.0

<151> 2000-04-28

40

45

50

55

60

65

ES 2 522 667 T3

<160> 54

5 <170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 492

10 <212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

15

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
1 5 10 15

20

Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
20 25 30

25

Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
35 40 45

30

Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
50 55 60

Ser Ala Gln Gly Gly Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
65 70 75 80

35

Gly Asn Gly Gly Ala Ala Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
85 90 95

Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu
100 105 110

40

Thr Pro Asn His Thr Pro Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu
115 120 125

Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro
130 135 140

45

Asp Met Ala Asn Thr Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
145 150 155 160

Gly Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala
165 170 175

50

Glu Asn Asn Gln Thr Ala Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn
180 185 190

55

60

65

ES 2 522 667 T3

Pro Ser Ala Thr Asn Ser Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly
 195 200 205
 5 Asn Ser Val Val Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 210 215 220
 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
 225 230 235 240
 10 Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
 245 250 255
 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val
 260 265 270
 15 Gly Leu Val Ala Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile
 275 280 285
 20 Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser
 290 295 300
 Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val
 305 310 315 320
 25 Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr
 325 330 335
 Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu
 340 345 350
 30 Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val
 355 360 365
 35 Gln Gly Glu Pro Ser Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr
 370 375 380
 Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro
 385 390 395 400
 40 Ser Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val
 405 410 415
 45 Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys
 420 425 430
 Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu
 435 440 445
 50 Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu
 450 455 460
 Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly
 465 470 475 480
 55 Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485 490

60 <210> 2
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 65 <400> 2

ES 2 522 667 T3

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 5 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 10 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 15 Ser Ala Gln Gly Gly Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 20 Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu
 100 105 110
 Thr Pro Asn His Thr Pro Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu
 115 120 125
 25 Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 130 135 140
 30 Asp Met Ala Asn Thr Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala
 165 170 175
 35 Glu Asn Asn Gln Thr Ala Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn
 180 185 190
 40 Pro Ser Ala Thr Asn Ser Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly
 195 200 205
 Asn Ser Val Val Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 210 215 220
 45 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
 225 230 235 240
 50 Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
 245 250 255
 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val
 260 265 270
 55 Gly Leu Val Ala Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile
 275 280 285
 Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser
 290 295 300
 60 Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val
 305 310 315 320
 65 Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr
 325 330 335

ES 2 522 667 T3

Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu
 340 345 350
 5 Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val
 355 360 365
 Gln Gly Glu Pro Ser Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr
 370 375 380
 10 Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro
 385 390 395 400
 Ser Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val
 405 410 415
 15 Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys
 420 425 430
 20 Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu
 435 440 445
 Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu
 450 455 460
 25 Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly
 465 470 475 480
 Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485 490
 30
 <210> 3
 <211> 488
 <212> PRT
 35 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 3
 40 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 45 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 55 Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser
 100 105 110
 60 Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu
 115 120 125
 Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 130 135 140
 65

ES 2 522 667 T3

Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 145 150 155 160
 5 Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
 165 170 175
 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn
 10 180 185 190
 Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala
 195 200 205
 15 Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 210 215 220
 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
 20 225 230 235 240
 Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
 245 250 255
 25 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala
 260 265 270
 Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys
 275 280 285
 30 Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg
 290 295 300
 Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp
 35 305 310 315 320
 Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly
 325 330 335
 40 Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala
 340 345 350
 Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro
 355 360 365
 45 Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val
 370 375 380
 Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg
 50 385 390 395 400
 Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
 405 410 415
 55 Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala
 420 425 430
 Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly
 435 440 445
 60 Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
 450 455 460
 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
 65 465 470 475 480

ES 2 522 667 T3

Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
485

5 <210> 4
<211> 488
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis
10 <400> 4

15 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
1 5 10 15
Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
20 20 25 30
Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
35 40 45
Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
50 55 60
25 Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
65 70 75 80
30 Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
85 90 95
Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser
100 105 110
35 Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu
115 120 125
40 Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro
130 135 140
45 Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
145 150 155 160
Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
165 170 175
45 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn
180 185 190
50 Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala
195 200 205
55 Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
210 215 220
60 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
225 230 235 240
Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
245 250 255
60 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala
260 265 270
65 Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys
275 280 285

ES 2 522 667 T3

5 Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg
 290 295 300

Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp
 305 310 315 320

10 Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly
 325 330 335

Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala
 340 345 350

15 Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro
 355 360 365

Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val
 370 375 380

20 Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg
 385 390 395 400

25 Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
 405 410 415

Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala
 420 425 430

30 Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly
 435 440 445

Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
 450 455 460

35 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
 465 470 475 480

40 Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485

<210> 5
 <211> 497
 <212> PRT
 45 <213> Neisseria meningitidis

<400> 5

50 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30

55 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Thr Glu Asp Val Gly Glu
 35 40 45

Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Ser Gly Ala
 50 55 60

60 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Lys Gly Gly Gln Asp
 65 70 75 80

65 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
 85 90 95

ES 2 522 667 T3

Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro
 100 105 110
 5 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Ala
 115 120 125
 Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly
 10 130 135 140
 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp
 145 150 155 160
 15 Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr
 165 170 175
 Ala Asp Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser
 20 180 185 190
 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Ser
 195 200 205
 25 Asp Phe Gly Arg Ile Asn Val Ala Asn Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly
 210 215 220
 Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His Cys Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg
 225 230 235 240
 30 Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro Pro Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu
 245 250 255
 Ser Asp Glu Glu Lys Ile Asn Lys Tyr Lys Lys Asp Glu Gln Arg Glu
 35 260 265 270
 Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Glu Lys Asn Gly Thr Asn
 275 280 285
 40 Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala
 290 295 300
 Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met
 305 310 315 320
 45 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu
 325 330 335
 Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly
 50 340 345 350
 Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser
 355 360 365
 55 Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala
 370 375 380
 Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn
 60 385 390 395 400
 Gly Arg Pro Ser Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe
 405 410 415
 65 Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His
 420 425 430

ES 2 522 667 T3

5 Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys
 435 440 445
 Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr
 450 455 460
 10 Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr
 465 470 475 480
 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln
 485 490 495
 15 Asp
 <210> 6
 <211> 429
 <212> PRT
 20 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 6
 25 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Pro Leu Ser
 1 5 10
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 30 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Asn Ala Gly Glu
 35 40 45
 Gly Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Ala Gly Gly Ala
 50 55 60
 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Glu Gly Ser Gln Asp
 65 70 75 80
 40 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
 85 90 95
 45 Thr Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Ala Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro
 100 105 110
 Gln Asn Ala Ala Glu Ser Ala Asn Gln Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ala
 115 120 125
 50 Gly Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly
 130 135 140
 Gly Ser Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
 145 150 155 160
 55 Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
 165 170 175
 60 Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Leu Ser Asp Glu Glu Lys Ile Lys Arg Tyr Lys Lys Asp Glu
 195 200 205
 65 Gln Arg Glu Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Lys Lys Asp
 210 215 220

ES 2 522 667 T3

Gly Thr Asn Lys Tyr Ile Ile Phe Tyr Thr Asp Lys Pro Pro Thr Arg
 225 230 235 240

5 Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ile Pro
 245 250 255

Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu
 260 265 270

10 Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr
 275 280 285

Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg
 290 295 300

15 Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Val Gly Thr Ala Val
 305 310 315 320

Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn Gly Arg Pro Tyr
 325 330 335

Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser
 340 345 350

25 Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln
 355 360 365

Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr
 370 375 380

30 Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly
 385 390 395 400

Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys
 405 410 415

Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Asp Arg Asp
 420 425

40

<210> 7
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

45

<400> 7

50 Met Phe Glu Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30

55 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45

Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60

60 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80

Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95

65

ES 2 522 667 T3

5 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ser Ala Glu Ser Ala Asn Gln
100 105 110

5 Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ala Asp Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser
115 120 125

10 Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu
130 135 140

15 Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr
145 150 155 160

15 His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu
165 170 175

20 Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Asn Leu Asn Glu Ser Glu Arg Ile
180 185 190

20 Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val
195 200 205

25 Ala Thr Ala Val Gln Ala Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr
210 215 220

25 Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala
225 230 235 240

30 Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn
245 250 255

35 Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly
260 265 270

35 His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr
275 280 285

40 Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln
290 295 300

40 Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn
305 310 315 320

45 Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr
325 330 335

45 Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp
340 345 350

50 Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe
355 360 365

55 Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn
370 375 380

55 Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu
385 390 395 400

60 Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly
405 410 415

60 Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
420 425

65 <210> 8

ES 2 522 667 T3

Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ser Ala Glu Ser Ala Asn Gln
 100 105 110
 5 Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ala Asp Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser
 115 120 125
 Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu
 130 135 140
 10 Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu
 165 170 175
 15 Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Asn Leu Asn Glu Ser Glu Arg Ile
 180 185 190
 Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val
 195 200 205
 20 Ala Thr Ala Val Gln Ala Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr
 210 215 220
 25 Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn
 245 250 255
 30 Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly
 260 265 270
 His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr
 275 280 285
 35 Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln
 290 295 300
 40 Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr
 325 330 335
 45 Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp
 340 345 350
 Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe
 355 360 365
 50 Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn
 370 375 380
 55 Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu
 385 390 395 400
 Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly
 405 410 415
 60 Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425

65 <210> 8

ES 2 522 667 T3

Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn
 305 310 315 320
 5 Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr
 325 330 335
 Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp
 340 345 350
 10 Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe
 355 360 365
 Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn
 370 375 380
 15 Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu
 385 390 395 400
 20 Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly
 405 410 415
 Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425
 25
 <210> 9
 <211> 427
 <212> PRT
 30 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 9
 35 Met Phe Glu Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 40 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 50 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ser Ala Glu Ser Ala Asn Gln
 100 105 110
 55 Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ala Asp Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser
 115 120 125
 Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu
 130 135 140
 60 Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 65 His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu
 165 170 175

ES 2 522 667 T3

5 Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Asn Leu Asn Glu Ser Glu Arg Ile
 180 185 190
 Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val
 195 200 205
 10 Ala Thr Ala Val Gln Ala Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr
 210 215 220
 Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala
 225 230 235 240
 15 Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn
 245 250 255
 Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly
 260 265 270
 20 His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr
 275 280 285
 Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln
 290 295 300
 25 Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn
 305 310 315 320
 30 Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr
 325 330 335
 Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp
 340 345 350
 35 Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe
 355 360 365
 Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn
 370 375 380
 40 Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu
 385 390 395 400
 45 Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly
 405 410 415
 Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425
 50 <210> 10
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 55 <400> 10
 60 Met Phe Glu Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 65 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45

ES 2 522 667 T3

	Val	Lys	Glu	Asp	Ala	Pro	Gln	Ala	Gly	Ser	Gln	Gly	Gln	Gly	Ala	Pro
	50						55					60				
5	Ser	Thr	Gln	Gly	Ser	Gln	Asp	Met	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Glu	Asn	Thr
	65					70					75					80
	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Thr	Asp	Lys	Pro	Lys	Asn	Glu	Asp	Glu
10					85					90					95	
	Gly	Pro	Gln	Asn	Asp	Met	Leu	Gln	Asn	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Asn	Gln
				100					105						110	
15	Thr	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro	Ala	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ala	Pro	Ala	Ser
			115					120					125			
	Asn	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly	Ser	Asn	Phe	Gly	Arg	Val	Asp	Leu
20							135					140				
	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr
	145					150					155					160
25	His	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Cys	Asn	Gly	Asp	Asn	Leu	Leu	Asp	Glu	Glu
					165					170					175	
	Ala	Pro	Ser	Lys	Ser	Glu	Phe	Glu	Asn	Leu	Asn	Glu	Ser	Glu	Arg	Ile
				180					185					190		
30	Glu	Lys	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly	Lys	Ser	Asp	Lys	Phe	Thr	Asn	Leu	Val
			195					200					205			
	Ala	Thr	Ala	Val	Gln	Ala	Asn	Gly	Thr	Asn	Lys	Tyr	Val	Ile	Ile	Tyr
35							215					220				
	Lys	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Phe	Ala	Arg	Phe	Arg	Arg	Ser	Ala
	225					230					235					240
40	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Met	Pro	Leu	Ile	Pro	Val	Asn
					245					250					255	
	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Val	Asp	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Leu	Thr	Gly
				260					265					270		
45	His	Ser	Gly	Asn	Ile	Phe	Ala	Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Thr
			275					280					285			
	Tyr	Gly	Ala	Glu	Lys	Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Leu	Arg	Val	Gln
50							295					300				
	Gly	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly	Glu	Met	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Tyr	Asn
	305					310					315					320
55	Gly	Glu	Val	Leu	His	Phe	His	Thr	Glu	Asn	Gly	Arg	Pro	Tyr	Pro	Thr
					325					330					335	
	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Asp
60				340					345					350		
	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Met	Gly	Thr	Gln	Lys	Phe
			355					360					365			
65	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Gly	Asn	Gly	Phe	Lys	Gly	Thr	Trp	Thr	Glu	Asn
		370					375					380				

ES 2 522 667 T3

Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu
 385 390 395 400
 5 Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly
 405 410 415
 Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425
 10
 <210> 11
 <211> 428
 <212> PRT
 15 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 11
 20 Met Phe Glu Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ile Cys Pro Met Leu Asn Arg Arg
 20 25
 25 Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr
 35 40 45
 Glu Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala
 50 55 60
 30 Pro Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn
 65 70 75 80
 35 Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp
 85 90 95
 Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ser Ala Glu Ser Ala Asn
 100 105 110
 40 Gln Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ala Asp Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala
 115 120 125
 Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp
 130 135 140
 45 Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu
 145 150 155 160
 50 Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu
 165 170 175
 Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Asn Leu Asn Glu Ser Glu Arg
 180 185 190
 55 Ile Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu
 195 200 205
 Val Ala Thr Ala Val Gln Ala Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile
 210 215 220
 60 Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser
 225 230 235 240
 65 Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val
 245 250 255

ES 2 522 667 T3

Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr
 260 265 270
 5 Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu
 275 280 285
 Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val
 290 295 300
 10 Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr
 305 310 315 320
 Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro
 325 330 335
 15 Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val
 340 345 350
 20 Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys
 355 360 365
 Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu
 370 375 380
 25 Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu
 385 390 395 400
 30 Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly
 405 410 415
 Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425
 35 <210> 12
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 40 <400> 12
 45 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 50 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Asp
 35 40 45
 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 55 Ser Ala Gln Gly Gly Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 60 Gly Asn Gly Gly Ala Glu Thr Ala Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu
 85 90 95
 Gly Thr Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Glu Ser Ala Asn Gln
 100 105 110
 65 Thr Gly Asn Asn Gln Ser Ala Gly Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser
 115 120 125

ES 2 522 667 T3

Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val
 130 135 140
 5 Gly Asn Ser Val Val Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asp Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu
 165 170 175
 10 Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Asp Asn Leu Ser Glu Ser Glu Arg Met
 180 185 190
 15 Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Gly Phe Val
 195 200 205
 Ala Asp Lys Leu Gln Met Lys Gly Thr Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr
 210 215 220
 20 Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser
 225 230 235 240
 Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala
 245 250 255
 25 Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser
 260 265 270
 30 Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly
 275 280 285
 Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu
 290 295 300
 35 Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu
 305 310 315 320
 Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Ser Arg Gly
 325 330 335
 40 Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile
 340 345 350
 45 Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala
 355 360 365
 Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly
 370 375 380
 50 Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala
 385 390 395 400
 55 Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly
 405 410 415
 Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425

60 <210> 13
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 65 <400> 13

ES 2 522 667 T3

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 5 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 10 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 15 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 20 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln
 100 105 110
 25 Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Asn Phe Gly Arg
 130 135 140
 30 Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr His Cys Lys Ser Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu
 165 170 175
 35 Ser Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Gln Leu Ser Asp Glu
 180 185 190
 40 Asp Lys Ile Lys Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Phe Thr Gly Leu
 195 200 205
 Val Ala Asp Arg Leu Gln Met Lys Gly Thr Asn Gln Tyr Ile Ile Phe
 210 215 220
 45 Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg
 225 230 235 240
 50 Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln
 245 250 255
 Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His
 260 265 270
 55 Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr
 275 280 285
 60 Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly
 290 295 300
 Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly
 305 310 315 320
 65 Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Lys
 325 330 335

ES 2 522 667 T3

5 Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly
 340 345 350
 Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Lys Gln Lys Phe Lys
 355 360 365
 10 Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly
 370 375 380
 Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val
 385 390 395 400
 15 Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe
 405 410 415
 Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425
 20 <210> 14
 <211> 426
 <212> PRT
 25 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 14
 30 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 35 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 40 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 45 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln
 100 105 110
 50 Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro
 115 120 125
 55 Ala Pro Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Asn Phe Gly Arg
 130 135 140
 Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile
 145 150 155 160
 60 Thr Leu Thr His Cys Lys Ser Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu
 165 170 175
 Ser Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Gln Leu Ser Asp Glu
 180 185 190
 65 Asp Lys Ile Lys Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Phe Thr Gly Leu
 195 200 205

ES 2 522 667 T3

5 Val Ala Asp Arg Leu Gln Met Lys Gly Thr Asn Gln Tyr Ile Ile Phe
 210 215 220

5 Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg
 225 230 235 240

10 Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln
 245 250 255

10 Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His
 260 265 270

15 Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr
 275 280 285

20 Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly
 290 295 300

20 Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly
 305 310 315 320

25 Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Lys
 325 330 335

25 Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly
 340 345 350

30 Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Lys Gln Lys Phe Lys
 355 360 365

35 Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly
 370 375 380

35 Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val
 385 390 395 400

40 Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe
 405 410 415

40 Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425

<210> 15
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

50 <400> 15

55 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15

55 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30

60 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45

60 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60

65 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80

ES 2 522 667 T3

Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 5 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln
 100 105 110
 10 Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Asn Phe Gly Arg
 130 135 140
 Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr His Cys Lys Ser Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu
 165 170 175
 Ser Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Gln Leu Ser Asp Glu
 180 185 190
 Asp Lys Ile Lys Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Phe Thr Gly Leu
 195 200 205
 Val Ala Asp Arg Leu Gln Met Lys Gly Thr Asn Gln Tyr Ile Ile Phe
 210 215 220
 Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg
 225 230 235 240
 Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln
 245 250 255
 Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His
 260 265 270
 Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr
 275 280 285
 Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly
 290 295 300
 Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Lys
 325 330 335
 Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly
 340 345 350
 Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Lys Gln Lys Phe Lys
 355 360 365
 Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly
 370 375 380
 Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val
 385 390 395 400
 Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe
 405 410 415

ES 2 522 667 T3

Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425

5 <210> 16
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

10 <400> 16

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln
 100 105 110
 Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Asn Phe Gly Arg
 130 135 140
 Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr His Cys Lys Ser Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu
 165 170 175
 Ser Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Gln Leu Ser Asp Glu
 180 185 190
 Asp Lys Ile Lys Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Phe Thr Gly Leu
 195 200 205
 Val Ala Asp Arg Leu Gln Met Lys Gly Thr Asn Gln Tyr Ile Ile Phe
 210 215 220
 Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg
 225 230 235 240
 Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln
 245 250 255
 Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His
 260 265 270
 Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr
 275 280 285

ES 2 522 667 T3

5 Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly
290 295 300

Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly
305 310 315 320

10 Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Lys
325 330 335

Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly
340 345 350

15 Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Lys Gln Lys Phe Lys
355 360 365

Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly
370 375 380

20 Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val
385 390 395 400

25 Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe
405 410 415

Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
420 425

30 <210> 17
<211> 426
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

35 <400> 17

40 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
1 5 10 15

Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
20 25 30

45 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
35 40 45

Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
50 55 60

50 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
65 70 75 80

Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
85 90 95

55 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln
100 105 110

60 Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Asn Phe Gly Arg
130 135 140

65 Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile
145 150 155 160

ES 2 522 667 T3

Thr Leu Thr His Cys Lys Ser Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu
 165 170 175
 5 Ser Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Gln Leu Ser Asp Glu
 180 185 190
 Asp Lys Ile Lys Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Phe Thr Gly Leu
 195 200 205
 10 Val Ala Asp Arg Leu Gln Met Lys Gly Thr Asn Gln Tyr Ile Ile Phe
 210 215 220
 Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg
 225 230 235 240
 15 Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln
 245 250 255
 20 Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His
 260 265 270
 Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr
 275 280 285
 25 Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly
 290 295 300
 30 Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Lys
 325 330 335
 35 Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly
 340 345 350
 Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Lys Gln Lys Phe Lys
 355 360 365
 40 Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly
 370 375 380
 45 Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val
 385 390 395 400
 Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe
 405 410 415
 50 Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425

<210> 18
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 18

60 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10
 65 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30

ES 2 522 667 T3

Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 5 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 10 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln
 100 105 110
 15 Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Asn Phe Gly Arg
 130 135 140
 20 Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile
 145 150 155 160
 25 Thr Leu Thr His Cys Lys Ser Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu
 165 170 175
 Ser Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Gln Leu Ser Asp Glu
 180 185 190
 30 Asp Lys Ile Lys Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Phe Thr Gly Leu
 195 200 205
 35 Val Ala Asp Arg Leu Gln Met Lys Gly Thr Asn Gln Tyr Ile Ile Phe
 210 215 220
 Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg
 225 230 235 240
 40 Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln
 245 250 255
 Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His
 260 265 270
 45 Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr
 275 280 285
 50 Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly
 290 295 300
 Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly
 305 310 315 320
 55 Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Lys
 325 330 335
 Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly
 340 345 350
 60 Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Lys Gln Lys Phe Lys
 355 360 365
 65

ES 2 522 667 T3

Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly
 370 375 380

5 Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val
 385 390 395 400

Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe
 405 410 415

10 Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420 425

15 <210> 19
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

20 <400> 19

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15

25 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30

Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45

30 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60

35 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80

Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95

40 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln
 100 105 110

45 Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Asn Phe Gly Arg
 130 135 140

50 Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile
 145 150 155 160

Thr Leu Thr His Cys Lys Ser Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu
 165 170 175

55 Ser Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Gln Leu Ser Asp Glu
 180 185 190

60 Asp Lys Ile Lys Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Phe Thr Gly Leu
 195 200 205

Val Ala Asp Arg Leu Gln Met Lys Gly Thr Asn Gln Tyr Ile Ile Phe
 210 215 220

65 Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg
 225 230 235 240

ES 2 522 667 T3

5 Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln
245 250 255

Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His
260 265 270

10 Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr
275 280 285

Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly
290 295 300

15 Lys Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly
305 310 315 320

Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Arg
325 330 335

20 Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly
340 345 350

Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys
355 360 365

Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Asn Trp Thr Glu Asn Gly
370 375 380

30 Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val
385 390 395 400

Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe
405 410 415

35 Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
420 425

40 <210> 20
<211> 419
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

45 <400> 20

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
1 5 10 15

50 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
20 25 30

Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
35 40 45

55 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
50 55 60

60 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
65 70 75 80

Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
85 90 95

65 Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Glu Ser Ala Asn Gln
100 105 110

ES 2 522 667 T3

Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ala Gly Ser Gln Asn Pro Ala Pro Ser Thr
 115 120 125
 5 Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Gly Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu
 130 135 140
 Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 10 His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Ala Glu Glu
 165 170 175
 Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Glu Asp Lys Ile
 180 185 190
 15 Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asp Lys Phe Val Gly Leu Ile Ala
 195 200 205
 20 Asp Arg Val Lys Lys Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Ile Ile Phe Tyr Thr
 210 215 220
 Asp Lys Pro Pro Thr Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 25 Glu Ile Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp
 245 250 255
 30 Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly Tyr Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro
 260 265 270
 Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly
 275 280 285
 35 Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met
 290 295 300
 40 Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met
 305 310 315 320
 Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val
 325 330 335
 45 Asn Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp
 340 345 350
 Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly
 355 360 365
 50 Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg
 370 375 380
 55 Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg
 385 390 395 400
 Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys
 405 410 415
 60 Glu Gln Asp

<210> 21

<211> 423

65 <212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

ES 2 522 667 T3

<400> 21

5 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
1 5 10 15

Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
10 20 25 30

Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
35 40 45

Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
50 55 60

Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
65 70 75 80

20 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
85 90 95

Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Glu Ser Ala Asn Gln
25 100 105 110

Ala Glu Lys Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr
115 120 125

30 Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala
130 135 140

Asn Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His
35 145 150 155 160

Cys Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro
165 170 175

40 Ser Lys Ser Glu Phe Glu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Arg Ile Asn Lys
180 185 190

Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val Ala Thr
195 200 205

45 Glu Val Gln Ala Asn Gly Val Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp
210 215 220

Lys Ser Ala Ser Ser Ala Gln Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg
50 225 230 235 240

Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr
245 250 255

55 Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn
260 265 270

Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu
60 275 280 285

Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala
290 295 300

65 Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Ser Gly Glu Val Leu
305 310 315 320

ES 2 522 667 T3

His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Ser Arg Gly Arg Phe
 325 330 335
 5 Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp
 340 345 350
 Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile
 355 360 365
 10 Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly Asp
 370 375 380
 Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys
 385 390 395 400
 Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe
 405 410 415
 20 Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 420
 <210> 22
 <211> 492
 25 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 22
 30 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10
 35 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 40 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 Ser Ala Gln Gly Gly Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 45 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 50 Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu
 100 105 110
 Thr Pro Asn His Thr Pro Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu
 115 120 125
 55 Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 130 135 140
 Asp Met Ala Asn Thr Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 145 150 155 160
 60 Gly Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala
 165 170 175
 65 Glu Asn Asn Gln Thr Ala Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn
 180 185 190

ES 2 522 667 T3

Pro Ser Ala Thr Asn Ser Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly
 195 200 205
 5 Asn Ser Val Val Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 210 215 220
 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
 225 230 235 240
 10 Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
 245 250 255
 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val
 260 265 270
 15 Gly Leu Val Ala Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile
 275 280 285
 Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser
 290 295 300
 20 Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val
 305 310 315 320
 25 Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr
 325 330 335
 Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu
 340 345 350
 30 Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val
 355 360 365
 35 Gln Gly Glu Pro Ser Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr
 370 375 380
 Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro
 385 390 395 400
 40 Ser Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val
 405 410 415
 45 Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys
 420 425 430
 Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu
 435 440 445
 50 Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu
 450 455 460
 Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly
 465 470 475 480
 55 Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485 490

60 <210> 23
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 65 <400> 23

ES 2 522 667 T3

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

ES 2 522 667 T3

Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu
 340 345 350
 5 Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val
 355 360 365
 Gln Gly Glu Pro Ser Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr
 370 375 380
 10 Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro
 385 390 395 400
 Ser Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val
 405 410 415
 15 Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys
 420 425 430
 Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu
 435 440 445
 20 Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu
 450 455 460
 25 Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly
 465 470 475 480
 Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485 490
 30 <210> 24
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 35 <400> 24
 40 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 45 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 55 Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser
 100 105 110
 Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu
 115 120 125
 60 Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 130 135 140
 65

ES 2 522 667 T3

5 Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
145 150 155 160

Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
165 170 175

10 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn
180 185 190

Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala
195 200 205

15 Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
210 215 220

20 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
225 230 235 240

Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
245 250 255

25 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala
260 265 270

Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys
275 280 285

30 Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg
290 295 300

35 Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp
305 310 315 320

Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly
325 330 335

40 Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala
340 345 350

Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro
355 360 365

45 Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val
370 375 380

50 Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg
385 390 395 400

Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
405 410 415

55 Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala
420 425 430

Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly
435 440 445

60 Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
450 455 460

65 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
465 470 475 480

ES 2 522 667 T3

Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
485

5 <210> 25
<211> 488
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis
10 <400> 25

15 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
1 5 10 15
Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
20 20 25 30
Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
35 40 45
Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
50 55 60
25 Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
65 70 75 80
Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
30 85 90 95
Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser
100 105 110
35 Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu
115 120 125
Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro
130 135 140
40 Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
145 150 155 160
Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
45 165 170 175
Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn
180 185 190
50 Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala
195 200 205
Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
210 215 220
55 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
225 230 235 240
Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
60 245 250 255
Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala
260 265 270
65 Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys
275 280 285

ES 2 522 667 T3

Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg
 290 295 300
 5 Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp
 305 310 315 320
 Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly
 325 330 335
 10 Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala
 340 345 350
 Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro
 355 360 365
 15 Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val
 370 375 380
 20 Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg
 385 390 395 400
 Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
 405 410 415
 25 Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala
 420 425 430
 Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly
 435 440 445
 30 Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
 450 455 460
 35 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
 465 470 475 480
 Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485
 40 <210> 26
 <211> 488
 <212> PRT
 45 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 26
 50 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 55 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 60 Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 65 Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95

ES 2 522 667 T3

Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser
 100 105 110
 5 Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu
 115 120 125
 Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 10 130 135 140
 Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 145 150 155 160
 15 Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
 165 170 175
 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn
 180 185 190
 20 Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala
 195 200 205
 Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 25 210 215 220
 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
 225 230 235 240
 30 Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
 245 250 255
 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala
 260 265 270
 35 Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys
 275 280 285
 40 Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg
 290 295 300
 Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp
 305 310 315 320
 45 Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly
 325 330 335
 Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala
 50 340 345 350
 Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro
 355 360 365
 55 Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val
 370 375 380
 Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg
 385 390 395 400
 60 Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
 405 410 415
 Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala
 65 420 425 430

ES 2 522 667 T3

Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly
 435 440 445
 5 Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
 450 455 460
 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
 465 470 475 480
 10 Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485
 15 <210> 27
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 20 <400> 27
 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 25 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 30 35 40
 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 35 Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 40 Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser
 100 105 110
 Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu
 115 120 125
 45 Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 130 135 140
 50 Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
 165 170 175
 55 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn
 180 185 190
 Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala
 195 200 205
 60 Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 210 215 220
 65 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val
 225 230 235 240

ES 2 522 667 T3

5 Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser
 245 250 255
 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala
 260 265 270
 10 Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys
 275 280 285
 Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg
 290 295 300
 15 Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp
 305 310 315 320
 Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly
 325 330 335
 20 Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala
 340 345 350
 Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro
 355 360 365
 25 Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val
 370 375 380
 30 Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg
 385 390 395 400
 Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
 405 410 415
 35 Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala
 420 425 430
 Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly
 435 440 445
 40 Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
 450 455 460
 45 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
 465 470 475 480
 Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485
 50 <210> 28
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 55 <400> 28
 60 Met Phe Glu Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 65 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45

ES 2 522 667 T3

Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
50 55 60

5 Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
65 70 75 80

Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
85 90 95

10 Gly Ala Gln Asp Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu
100 105 110

15 Thr Pro Asn His Thr Pro Ala Ser Asn Met Pro Ala Val Asn Met Glu
115 120 125

Asn Gln Ala Pro Asp Thr Gly Glu Ser Val Gln Pro Ala Asn Gln Pro
130 135 140

20 Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
145 150 155 160

25 Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
165 170 175

Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn
180 185 190

30 Pro Ala Thr Thr Asn Ser Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Ala
195 200 205

35 Asn Gly Ile Lys Leu Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
210 215 220

Cys Lys Asp Thr Val Cys Gly Ser Asn Phe Leu Ala Glu Glu Ala Pro
225 230 235 240

40 Ser Lys Ser Glu Phe Glu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Arg Ile Asn Lys
245 250 255

Tyr Lys Lys Asp Gly Gln Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val Ala Thr Glu
260 265 270

45 Val Lys Ala Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys
275 280 285

50 Ser Thr Ser Ser Ala Arg Val Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
290 295 300

Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
305 310 315 320

55 Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile
325 330 335

Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
340 345 350

60 Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys
355 360 365

65 Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
370 375 380

ES 2 522 667 T3

Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala
 385 390 395 400
 5 Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 405 410 415
 Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 420 425 430
 10 Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly Asp Val
 435 440 445
 Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Gly Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 450 455 460
 15 Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 465 470 475 480
 20 Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485
 <210> 29
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 29
 30 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 35 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 40 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 Ser Ala Gln Gly Gly Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 45 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 50 Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu
 100 105 110
 Thr Pro Asn His Thr Pro Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu
 115 120 125
 55 Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 130 135 140
 Asp Met Ala Asn Thr Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 145 150 155 160
 60 Gly Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
 165 170 175
 65 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn
 180 185 190

ES 2 522 667 T3

Pro Ala Thr Thr Asn Ser Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Ala
 195 200 205
 5 Asn Gly Ile Lys Leu Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 210 215 220
 Cys Lys Asp Thr Val Cys Gly Ser Asn Phe Leu Ala Glu Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 10 Ser Lys Ser Glu Phe Glu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Arg Ile Asn Lys
 245 250 255
 Tyr Lys Lys Asp Gly Gln Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val Ala Thr Glu
 260 265 270
 15 Val Lys Ala Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys
 275 280 285
 20 Ser Thr Ser Ser Ala Arg Val Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
 290 295 300
 Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
 305 310 315 320
 25 Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ile Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile
 325 330 335
 Phe Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
 340 345 350
 30 Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Lys Gly Glu Pro Ala Lys
 355 360 365
 35 Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
 370 375 380
 Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala
 385 390 395 400
 40 Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 405 410 415
 45 Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 420 425 430
 Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
 435 440 445
 50 Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 450 455 460
 55 Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 465 470 475 480
 Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485

60 <210> 30
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 65 <400> 30

ES 2 522 667 T3

1 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 5 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 10 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 15 Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 20 Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asn Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr
 25 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 30 Gly Ala Gln Asp Asp Met Pro Gln Lys Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu
 35 Thr Pro Asn His Thr Pro Ala Pro Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu
 40 Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 45 Asp Met Ala Asn Thr Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 50 Gly Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala
 55 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Ser Thr Pro Ala Ser Asn
 60 Ser Ala Thr Thr Asn Ser Gly Ser Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Ala
 65 Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 70 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala
 75 Pro Pro Lys Ser Glu Phe Glu Asn Leu Ser Asp Glu Glu Lys Ile Lys
 80 Arg Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Phe Thr Gly Leu Val Ala Thr Lys
 85 Val Glu Lys Lys Gly Val Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Thr Asp Lys
 90 Thr Pro Thr Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Ser Glu Glu Met
 95 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu
 100 Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Leu Glu Gly
 105 325 330 335

ES 2 522 667 T3

Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser
 340 345 350
 5 Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala
 355 360 365
 Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn
 370 375 380
 10 Gly Arg Ser Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe
 385 390 395 400
 Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His
 405 410 415
 15 Met Gly Lys Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys
 420 425 430
 Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr
 435 440 445
 20 Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr
 450 455 460
 25 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln
 465 470 475 480
 Asp
 30 <210> 31
 <211> 480
 <212> PRT
 35 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 31
 40 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 45 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45
 Val Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60
 Ser Thr Gln Gly Ser Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80
 55 Gly Asn Gly Gly Ser Ala Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu
 85 90 95
 Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu
 100 105 110
 60 Thr Pro Asn His Thr Pro Ala Pro Asn Met Pro Thr Gly Asp Met Gly
 115 120 125
 Asn Gln Ala Pro Asp Tyr Gly Glu Ser Ala Gln Pro Glu Asn Gln Pro
 130 135 140
 65

ES 2 522 667 T3

5 Asp Ala Ala Asn Ala Gly Asp Gly Ile Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala
 165 170 175
 10 Glu Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn
 180 185 190
 Pro Ser Thr Thr Asn Ser Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly
 195 200 205
 15 Asn Ser Val Val Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His
 210 215 220
 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asn Asp Asp Asn Leu Leu Tyr Glu Glu Ala
 225 230 235 240
 20 Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Ser Leu Ser Asp Glu Lys Lys Ile Glu
 245 250 255
 Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Phe Thr Gly Leu Val Ala Ile Lys
 260 265 270
 25 Val Glu Asn Asn Gly Leu Asn Lys Tyr Thr Ile Ile Tyr Gln Ala Gln
 275 280 285
 30 Pro Thr Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro
 290 295 300
 Leu Ile Pro Val Asn Gln Val Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala
 305 310 315 320
 35 Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn
 325 330 335
 Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr
 340 345 350
 40 Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly
 355 360 365
 Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn Gly
 370 375 380
 45 Arg Pro Ser Pro Phe Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly
 385 390 395 400
 50 Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met
 405 410 415
 Gly Lys Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly
 420 425 430
 55 Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly
 435 440 445
 Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp
 450 455 460
 60 Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 465 470 475 480

65 <210> 32

ES 2 522 667 T3

<211> 429
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 32

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Pro Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Asn Ala Gly Glu
 35 40 45
 Gly Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Ala Gly Gly Ala
 50 55 60
 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Glu Gly Ser Gln Asp
 65 70 75 80
 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
 85 90 95
 Thr Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Ala Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro
 100 105 110
 Gln Asn Ala Ala Glu Ser Ala Asn Gln Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ala
 115 120 125
 Gly Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly
 130 135 140
 Gly Ser Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
 145 150 155 160
 Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
 165 170 175
 Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Leu Ser Asp Glu Glu Lys Ile Lys Arg Tyr Lys Lys Asp Glu
 195 200 205
 Gln Arg Glu Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Lys Lys Asp
 210 215 220
 Gly Thr Asn Lys Tyr Ile Ile Phe Tyr Thr Asp Lys Pro Pro Thr Arg
 225 230 235 240
 Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ile Pro
 245 250 255
 Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu
 260 265 270
 Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr
 275 280 285
 Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg
 290 295 300

ES 2 522 667 T3

Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Val Gly Thr Ala Val
 305 310 315 320
 5 Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn Gly Arg Pro Tyr
 325 330 335
 Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser
 340 345 350
 10 Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln
 355 360 365
 15 Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr
 370 375 380
 Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly
 385 390 395 400
 20 Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys
 405 410 415
 Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Asp Arg Asp
 420 425
 25 <210> 33
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 30 <400> 33
 35 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Pro Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 40 Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ala Glu Asn Ala Gly Glu
 35 40 45
 Gly Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Ala Gly Gly Ala
 50 55 60
 45 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Glu Gly Ser Gln Asp
 65 70 75 80
 50 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
 85 90 95
 Thr Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Ala Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro
 100 105 110
 55 Gln Asn Ala Ala Glu Ser Ala Asn Gln Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ala
 115 120 125
 Gly Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly
 130 135 140
 60 Gly Ser Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
 145 150 155 160
 65 Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
 165 170 175

ES 2 522 667 T3

Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe
 180 185 190
 5 Glu Lys Leu Ser Asp Glu Glu Lys Ile Lys Arg Tyr Lys Lys Asp Glu
 195 200 205
 Gln Arg Glu Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Lys Lys Asp
 210 215 220
 10 Gly Thr Asn Lys Tyr Ile Ile Phe Tyr Thr Asp Lys Pro Pro Thr Arg
 225 230 235 240
 Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ile Pro
 245 250 255
 15 Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu
 260 265 270
 Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr
 275 280 285
 20 Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg
 290 295 300
 Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Val Gly Thr Ala Val
 305 310 315 320
 Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn Gly Arg Pro Tyr
 325 330 335
 30 Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser
 340 345 350
 Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln
 355 360 365
 35 Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr
 370 375 380
 Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly
 385 390 395 400
 Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys
 405 410 415
 45 Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Asp Arg Asp
 420 425
 50 <210> 34
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 55 <400> 34
 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 60 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Thr Glu Asp Val Gly Glu
 35 40 45
 65

ES 2 522 667 T3

Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Ser Gly Ala
 50 55 60
 5 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Lys Gly Gly Gln Asp
 65 70 75 80
 10 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
 85 90 95
 Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro
 100 105 110
 15 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Ala
 115 120 125
 20 Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly
 130 135 140
 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp
 145 150 155 160
 25 Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr
 165 170 175
 Ala Asp Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser
 180 185 190
 30 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Ser
 195 200 205
 35 Asp Phe Gly Arg Ile Asn Val Ala Asn Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly
 210 215 220
 Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His Cys Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg
 225 230 235 240
 40 Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro Pro Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu
 245 250 255
 Ser Asp Glu Glu Lys Ile Asn Lys Tyr Lys Lys Asp Glu Gln Arg Glu
 260 265 270
 45 Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Glu Lys Asn Gly Thr Asn
 275 280 285
 50 Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala
 290 295 300
 Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met
 305 310 315 320
 55 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu
 325 330 335
 60 Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly
 340 345 350
 Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser
 355 360 365
 65 Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala
 370 375 380

ES 2 522 667 T3

5 Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn
385 390 395 400

Gly Arg Pro Ser Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe
405 410 415

10 Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His
420 425 430

Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys
435 440 445

15 Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr
450 455 460

Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr
465 470 475 480

20 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln
485 490 495

25 Asp

<210> 35
<211> 497
<212> PRT
30 <213> Neisseria meningitidis

<400> 35

35 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
1 5 10 15

Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
20 25 30

40 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Thr Glu Asp Val Gly Glu
35 40 45

Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Ser Gly Ala
50 55 60

Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Lys Gly Gly Gln Asp
65 70 75 80

50 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
85 90 95

Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro
100 105 110

55 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Ala
115 120 125

Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly
130 135 140

60 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp
145 150 155 160

65 Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr
165 170 175

ES 2 522 667 T3

Ala Asp Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser
 180 185 190

5 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Ser
 195 200 205

Asp Phe Gly Arg Ile Asn Val Ala Asn Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly
 210 215 220

10 Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His Cys Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg
 225 230 235 240

Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro Pro Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu
 245 250 255

15 Ser Asp Glu Glu Lys Ile Asn Lys Tyr Lys Lys Asp Glu Gln Arg Glu
 260 265 270

20 Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Glu Lys Asn Gly Thr Asn
 275 280 285

Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala
 290 295 300

25 Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met
 305 310 315 320

30 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu
 325 330 335

Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly
 340 345 350

35 Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser
 355 360 365

Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala
 370 375 380

40 Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn
 385 390 395 400

45 Gly Arg Pro Ser Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe
 405 410 415

Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His
 420 425 430

50 Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys
 435 440 445

Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr
 450 455 460

55 Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr
 465 470 475 480

60 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln
 485 490 495

Asp

65 <210> 36
 <211> 497

ES 2 522 667 T3

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

5

<400> 36

10	Met	Phe	Lys	Arg	Ser	Val	Ile	Ala	Met	Ala	Cys	Ile	Val	Ala	Leu	Ser
	1				5					10					15	
	Ala	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Asp
			20						25					30		
15	Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Thr	Glu	Asp	Val	Gly	Glu
			35					40					45			
	Glu	Val	Leu	Pro	Lys	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Glu	Ala	Val	Ser	Gly	Ala
		50					55					60				
20	Pro	Gln	Ala	Asp	Thr	Gln	Asp	Ala	Thr	Ala	Gly	Lys	Gly	Gly	Gln	Asp
	65					70					75					80
	Met	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Glu	Asn	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Ala	Thr
25					85					90					95	
	Thr	Asp	Asn	Pro	Glu	Asn	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Gln	Asn	Asp	Met	Pro
				100					105					110		
30	Gln	Asn	Ala	Ala	Asp	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Pro	Asn	His	Thr	Pro	Ala
			115					120					125			
	Pro	Asn	Met	Pro	Thr	Arg	Asp	Met	Gly	Asn	Gln	Ala	Pro	Asp	Ala	Gly
		130					135					140				
35	Glu	Ser	Ala	Gln	Pro	Ala	Asn	Gln	Pro	Asp	Met	Ala	Asn	Ala	Ala	Asp
	145					150				155						160
	Gly	Met	Gln	Gly	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala	Gly	Glu	Asn	Ala	Gly	Asn	Thr
40					165					170					175	
	Ala	Asp	Gln	Ala	Ala	Asn	Gln	Ala	Glu	Asn	Asn	Gln	Val	Gly	Gly	Ser
				180					185					190		
45	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr	Asn	Gly	Gly	Ser
			195					200					205			
	Asp	Phe	Gly	Arg	Ile	Asn	Val	Ala	Asn	Gly	Ile	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly
50		210					215					220				
	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Leu	Thr	His	Cys	Lys	Asp	Lys	Val	Cys	Asp	Arg
	225					230					235					240
	Asp	Phe	Leu	Asp	Glu	Glu	Ala	Pro	Pro	Lys	Ser	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu
55					245					250					255	
	Ser	Asp	Glu	Glu	Lys	Ile	Asn	Lys	Tyr	Lys	Lys	Asp	Glu	Gln	Arg	Glu
			260						265					270		
60	Asn	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Asp	Arg	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Thr	Asn
			275					280					285			
	Lys	Tyr	Val	Ile	Ile	Tyr	Lys	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala
65		290					295					300				

ES 2 522 667 T3

5 Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met
 305 310 315 320
 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu
 325 330 335
 10 Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly
 340 345 350
 Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser
 355 360 365
 15 Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala
 370 375 380
 Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn
 385 390 395 400
 20 Gly Arg Pro Ser Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe
 405 410 415
 Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His
 420 425 430
 25 Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys
 435 440 445
 Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr
 450 455 460
 Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr
 465 470 475 480
 35 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln
 485 490 495
 Asp
 40 <210> 37
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 45 <400> 37
 50 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30
 55 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Thr Glu Asp Val Gly Glu
 35 40 45
 Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Ser Gly Ala
 50 55 60
 60 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Lys Gly Gly Gln Asp
 65 70 75 80
 65 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
 85 90 95

ES 2 522 667 T3

Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro
 100 105 110
 5 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Ala
 115 120 125
 Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly
 10 130 135 140
 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp
 145 150 155 160
 15 Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr
 165 170 175
 Ala Asp Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser
 180 185 190
 20 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Ser
 195 200 205
 Asp Phe Gly Arg Ile Asn Val Ala Asn Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly
 25 210 215 220
 Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His Cys Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg
 225 230 235 240
 30 Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro Pro Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu
 245 250 255
 Ser Asp Glu Glu Lys Ile Asn Lys Tyr Lys Lys Asp Glu Gln Arg Glu
 35 260 265 270
 Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Glu Lys Asn Gly Thr Asn
 275 280 285
 40 Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala
 290 295 300
 Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met
 305 310 315 320
 45 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu
 325 330 335
 Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly
 340 345 350
 50 Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser
 355 360 365
 55 Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala
 370 375 380
 Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn
 385 390 395 400
 60 Gly Arg Pro Ser Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe
 405 410 415
 65 Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His
 420 425 430

ES 2 522 667 T3

Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys
 435 440 445

5 Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr
 450 455 460

Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr
 465 470 475 480

10 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln
 485 490 495

15 Asp

<210> 38
 <211> 497
 <212> PRT
 20 <213> Neisseria meningitidis

<400> 38

25 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30

30 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Thr Glu Asp Val Gly Glu
 35 40 45

Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Ser Gly Ala
 50 55 60

Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Lys Gly Gly Gln Asp
 65 70 75 80

40 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
 85 90 95

Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro
 100 105 110

45 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Ala
 115 120 125

Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly
 130 135 140

50 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp
 145 150 155 160

Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr
 165 170 175

55 Ala Asp Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser
 180 185 190

60 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Ser
 195 200 205

65 Asp Phe Gly Arg Ile Asn Val Ala Asn Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly
 210 215 220

ES 2 522 667 T3

Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His Cys Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg
 225 230 235 240
 5 Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro Pro Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu
 245 250 255
 Ser Asp Glu Glu Lys Ile Asn Lys Tyr Lys Lys Asp Glu Gln Arg Glu
 260 265 270
 10 Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Glu Lys Asn Gly Thr Asn
 275 280 285
 Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ala
 290 295 300
 15 Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met
 305 310 315 320
 20 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu
 325 330 335
 Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly
 340 345 350
 25 Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser
 355 360 365
 Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala
 370 375 380
 30 Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn
 385 390 395 400
 35 Gly Arg Pro Ser Leu Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe
 405 410 415
 Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His
 420 425 430
 40 Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys
 435 440 445
 Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr
 450 455 460
 45 Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr
 465 470 475 480
 50 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln
 485 490 495
 Asp
 55 <210> 39
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 60 <400> 39
 65 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10 15

ES 2 522 667 T3

Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 25 30

5 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu
 35 40 45

Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro
 50 55 60

10 Ser Ala Gln Gly Gly Gln Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr
 65 70 75 80

15 Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu
 85 90 95

Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser
 100 105 110

20 Thr Pro Asn His Thr Pro Ala Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly
 115 120 125

25 Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro
 130 135 140

Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala
 145 150 155 160

30 Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr Ala Asp Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu
 165 170 175

Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro
 180 185 190

35 Asn Ala Thr Asn Gly Gly Ser Asp Phe Gly Arg Ile Asn Val Ala Asn
 195 200 205

40 Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His Cys
 210 215 220

Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro Pro
 225 230 235 240

45 Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Glu Glu Lys Ile Asn Lys Tyr
 245 250 255

Lys Lys Asp Glu Gln Arg Glu Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg
 260 265 270

50 Val Glu Lys Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys
 275 280 285

55 Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg
 290 295 300

Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp
 305 310 315 320

60 Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly
 325 330 335

65 Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala
 340 345 350

ES 2 522 667 T3

Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro
355 360 365

5 Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val
370 375 380

Leu His Phe His Met Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Gly Gly Arg
385 390 395 400

10 Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
405 410 415

Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val
420 425 430

15 Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly
435 440 445

20 Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
450 455 460

Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
465 470 475 480

25 Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
485

30 <210> 40
<211> 496
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

35 <400> 40

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser
1 5 10 15

40 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
20 25 30

Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Thr Glu Asp Val Gly Glu
35 40 45

45 Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Ser Gly Ala
50 55 60

50 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Lys Gly Gly Gln Asp
65 70 75 80

Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
85 90 95

55 Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro
100 105 110

60 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Ala
115 120 125

Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ser Gly
130 135 140

65 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp
145 150 155 160

ES 2 522 667 T3

Gly Ile Gln Gly Asp Asp Pro Ser Val Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr
 165 170 175
 5 Ala Asp Gln Ala Glu Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser
 180 185 190
 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Gly
 195 200 205
 10 Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp Gly Pro
 210 215 220
 Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asp Gly
 225 230 235 240
 Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Asp Asn
 245 250 255
 20 Leu Ser Glu Ser Glu Arg Met Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Ser
 260 265 270
 Asp Lys Phe Thr Gly Phe Val Ala Asp Lys Leu Gln Met Lys Gly Thr
 275 280 285
 25 Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ser Ala Arg
 290 295 300
 Phe Arg Arg Ser Ala Arg Leu Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro
 305 310 315 320
 Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala
 325 330 335
 35 Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn
 340 345 350
 Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr
 355 360 365
 40 Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly
 370 375 380
 Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly
 385 390 395 400
 45 Arg Pro Tyr Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly
 405 410 415
 Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met
 420 425 430
 Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly
 435 440 445
 55 Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly
 450 455 460
 Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp
 465 470 475 480
 60 Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485 490 495

65 <210> 41

ES 2 522 667 T3

<211> 493
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 41

5
 10 Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Phe Ala Leu Ser
 1 5 10
 15 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp
 20 20 25 30
 20 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Val Pro Val Val Ala Glu Asp Ala Gly Glu
 35 40 45
 25 Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Gly Gly Ala
 50 55 60
 30 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Glu Gly Ser Gln Asp
 65 70 75 80
 35 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr
 85 90 95
 40 Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Ala Gly Ala Gln Asn Asp Met Pro
 100 105 110
 45 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn Tyr Thr Thr Ala
 115 120 125
 50 Pro Asn Met Pro Ala Val Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ser Gly
 130 135 140
 55 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp
 145 150 155 160
 60 Gly Ile Gln Gly Asp Asp Pro Ser Val Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr
 165 170 175
 65 Ala Asp Gln Ala Glu Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser
 180 185 190
 70 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Gly
 195 200 205
 75 Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp Gly Pro
 210 215 220
 80 Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Asn Asp
 225 230 235 240
 85 Asp Asn Leu Leu Tyr Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe Glu Ser
 245 250 255
 90 Leu Asn Asp Ser Gly Arg Ile Asp Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Gln Asp
 260 265 270
 95 Lys Phe Thr Asn Leu Val Ala Thr Lys Val Glu Lys Lys Gly Leu Asn
 275 280 285
 100 Lys Tyr Val Ile Phe Tyr Thr Asp Thr Pro Pro Thr Arg Ser Ala Arg
 290 295 300

ES 2 522 667 T3

5 Ser Arg Arg Leu Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro
 305 310 315 320

5 Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu
 325 330 335

10 Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr
 340 345 350

15 Leu Thr Tyr Arg Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg
 355 360 365

20 Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val
 370 375 380

25 Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr
 385 390 395 400

30 Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser
 405 410 415

35 Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln
 420 425 430

40 Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr
 435 440 445

45 Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly
 450 455 460

50 Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys
 465 470 475 480

55 Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485 490

<210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 42

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile
 1 5 10

<210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 43

Ala Leu Ser Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Asp Thr
 20

<210> 44
 <211> 8

ES 2 522 667 T3

<212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 5
 <400> 44

 Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val
 1 5
 10
 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 15
 <400> 45

 Gln Asp Met Ala Ala Val Ser
 1 5
 20
 <210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 25
 <400> 46

 Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr Thr Asp
 1 5 10
 30
 <210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 35
 <400> 47

 Gln Asn Asp Met Pro Gln
 1 5
 40
 <210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 45
 <400> 48

 Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys
 1 5 10
 50
 <210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 55
 <400> 49

 Lys Ser Glu Phe Glu
 1 5
 60
 <400> 49

 Lys Ser Glu Phe Glu
 1 5
 65

ES 2 522 667 T3

5 <210> 50
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 50
 10 Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu
 1 5 10 15
 15 Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val
 20 25 30
 Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr
 35 40 45
 20 Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu
 50 55
 25 <210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 51
 30 Gly Gly Ser Tyr Ala Leu
 1 5
 35 <210> 52
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 40 <400> 52
 Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val
 1 5 10 15
 45 Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His
 20 25
 50 <210> 53
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 53
 55 Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly
 1 5 10 15
 60 Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly
 20 25
 65 <210> 54
 <211> 62
 <212> PRT

ES 2 522 667 T3

<213> Neisseria meningitidis

5

<220>

<221> misc_feature

<222> 27

10

<223> 'Xaa' is Arg or Lys

<400> 54

15

Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp
1 5 10 15

Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Xaa Phe Tyr Gly Pro Ala
20 25 30

20

Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu
35 40 45

25

Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Asp Arg Asp
50 55 60

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una proteína que comprende un fragmento de una proteína de Neisseria, la proteína de Neisseria tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SECs ID N° 1 a 6, en la que dicho fragmento comprende una región antigénica de la proteína de Neisseria y consiste en 7 o más aminoácidos conservados consecutivos, en la que los aminoácidos conservados se encuentran en al menos el 50 % o más de las SECs ID N° 1 a 6, con la condición de que dicha proteína no es una proteína completa de Neisseria que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SECs ID N° 1 a 41.
- 10 **2.** Una proteína según la reivindicación 1, en la que los aminoácidos conservados se encuentran en al menos el 50 % o más de las SECs ID N° 1 a 41.
- 3.** La proteína de la reivindicación 1, en la que dicho fragmento consiste en 20 o más aminoácidos conservados consecutivos.
- 15 **4.** Una proteína según la reivindicación 1, que comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: (a) MFKRSVIAMACI; (b) ALSACGGGGGGSPDVKSADT; (c) SKPAAPVV; (d) QDMAAVS; (e) ENTGNGGAATTD; (f) DGPSQNILTHCK; (g) RRSARSRRLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNRYLYGA EKL; (h) VQGEPAKGEMLAGTAVYNGEVLHFFH; (i) GRFAAKVDFGSKSVDLIIDS GDDLHMG; (j) 20 QKFKAADGNGFKGTWTENGGDVSG(R / K) FYGPAGEEVAGK YSYRPTDAEKGGFGVFAGKKDRD.
- 5.** Un ácido nucleico que codifica una proteína según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 25 **6.** Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
- 7.** El vector de la reivindicación 6, que es un vector de expresión.
- 8.** Una célula huésped transformada con el vector de las reivindicaciones 6 o 7.
- 30 **9.** Una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el ácido nucleico según la reivindicación 5, para su uso como medicamento.
- 10.** El uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el ácido nucleico según la 35 reivindicación 5, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la infección debido a la bacteria Neisseria.
- 11.** El uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el ácido nucleico según la 40 reivindicación 5, en la fabricación de un reactivo de diagnóstico multiespecífico.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1

```

287 14 MFKRSVIAMACIFALSACGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVSE...KETEAKETEAKETEAKETEAKETEAKETE
287 2 MFKRSVIAMACIFALSACGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVSE...KETEAKETEAKETEAKETEAKETEAKETE
287 21 MFKRSVIAMACIFALSACGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVSE...KETEAKETEAKETEAKETEAKETEAKETE
z2491 MFKRSVIAMACIFALSACGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVSE...KETEAKETEAKETEAKETEAKETEAKETE
287 9 MFKRSVIAMACIVALSACGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVSE...DVGEEVLPKEKKEDEEA
fa1090 MFKRSVIAMACIFPLSACGGGGSPDVKSADTPSKPAAPVVAENAGEGVLPEKKEDEEA

```

```

287 14 KEDAPQAGSQCGAPSACGGQDMAAVSEENTGNGGAATDKPKNEDEGAQNDMPQNAADT
287 2 KEDAPQAGSQCGAPSACGGQDMAAVSEENTGNGGAATDKPKNEDEGAQNDMPQNAADT
287 21 KEDAPQAGSQCGAPSACGGQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDEVVAQNDMPQNAAGT
z2491 KEDAPQAGSQCGAPSACGGQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDEVVAQNDMPQNAAGT
287 9 VSGAPQADT..QDATABGKGGQDMAAVSAENTGNGGAATDNPENKDEGPPQNDMPQNAADT
fa1090 AGAPQADT..QDATABGKGGQDMAAVSAENTGNGGAATDNPKNEDAGAQNDMPQNA..

```

```

287 14 DSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMANFADGMQGDDPSAGGENAGNTA
287 2 DSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMANFADGMQGDDPSAGGENAGNTA
287 21 DSSLTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAFADGMQGDDPSAGGENAGNTA
z2491 DSSLTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAFADGMQGDDPSAGGENAGNTA
287 9 DSSLTPNHTPAPNMPTRDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAFADGMQGDDPSA.GENAGNTA
fa1090 .....

```

```

287 14 AQTNQAEENNQTAGSQNPASSITNPSATNSGGDFGRITNVGNSSVVIDGPPSQNITLTHCKGDS
287 2 AQTNQAEENNQTAGSQNPASSITNPSATNSGGDFGRITNVGNSSVVIDGPPSQNITLTHCKGDS
287 21 AQCANQAGNNQAAAGSSDPIPASNPAPANGSNFGRVDIANGVIFIDGPPSQNITLTHCKGDS
z2491 AQCANQAGNNQAAAGSSDPIPASNPAPANGSNFGRVDIANGVIFIDGPPSQNITLTHCKGDS
287 9 DQANQAEENNQVCGSQNPASSITNPATNGGSDFGRINVANGIKIDSGSENITLTHCKDKV
fa1090 .ESANQTEGNNQAPAGSSDSAPASNPAPANGSDFGRITNVGNSSVVIDGPPSQNITLTHCKGDS

```

Figura 1 Cont.

287 14 CS GNNFLDEEVQLKSEFEKLSADADKISNYKKDGKNDGKNDKGVGLVADSVQMKGINQYII
 287 2 CS GNNFLDEEVQLKSEFEKLSADADKISNYKKDGKNDGKNDKGVGLVADSVQMKGINQYII
 287 21 CS GNNFLDEEVQLKSEFEKLSADADKISNYKK...DGKNDKGVGLVADSVQMKGINQYII
 z2491 CS GNNFLDEEVQLKSEFEKLSADADKISNYKK...DGKNDKGVGLVADSVQMKGINQYII
 287 9 CDRD FLDEEAPPKSEFEKLSDEEKINNYKK...DEQRENFGVGLVADRVKKNGTNKYII
 fa1090 CNGDNFLDEEAPSPKSEFEKLSDEEKIKRYKK...DEQRENFGVGLVADRVKKNGTNKYII

287 14 FYKPKP...TSFARFRRSARRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEG
 287 2 FYKPKP...TSFARFRRSARRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEG
 287 21 FYKPKP...TSFARFRRSARRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEG
 z2491 FYKPKP...TSFARFRRSARRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEG
 287 9 IYKDKSASSSARFRRSARRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEG
 fa1090 FYTDKPT...RSARFRRSARRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEG

287 14 NYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPSPSRGRFAA
 287 2 NYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPSPSRGRFAA
 287 21 NYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAA
 z2491 NYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAA
 287 9 NYRYLTYGAEKLSGGSYALRVQGEPAKGEMLAGTAVYNGEVLHFHMENGRPSPSGRFAA
 fa1090 NYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLVGTAVYNGEVLHFHMENGRPYPSGRFAA

287 14 KVDFGSKSVVDGIIDSGDGLHMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGGDVSCKFYGPAGEEVA
 287 2 KVDFGSKSVVDGIIDSGDGLHMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGGDVSCKFYGPAGEEVA
 287 21 KVDFGSKSVVDGIIDSGDD LHMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGS GDVSKFYGPAGEEVA
 z2491 KVDFGSKSVVDGIIDSGDD LHMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGS GDVSKFYGPAGEEVA
 287 9 KVDFGSKSVVDGIIDSGDD LHMGTQKFKAVIDGNGFKGTWTENGGDVSCKFYGPAGEEVA
 fa1090 KVDFGSKSVVDGIIDSGDD LHMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGGDVSCKFYGPAGEEVA

Figura 1 Cont.

287	14	GKYSYRPTDAEKGGFVFAGKKEQD	*
287	2	GKYSYRPTDAEKGGFVFAGKKEQD	*
287	21	GKYSYRPTDAEKGGFVFAGKKEQD	*
z2491		GKYSYRPTDAEKGGFVFAGKKEQD	*
287	9	GKYSYRPTDAEKGGFVFAGKKEQD	*
fa1090		GKYSYRPTDAEKGGFVFAGKKEQD	*

Figura 2

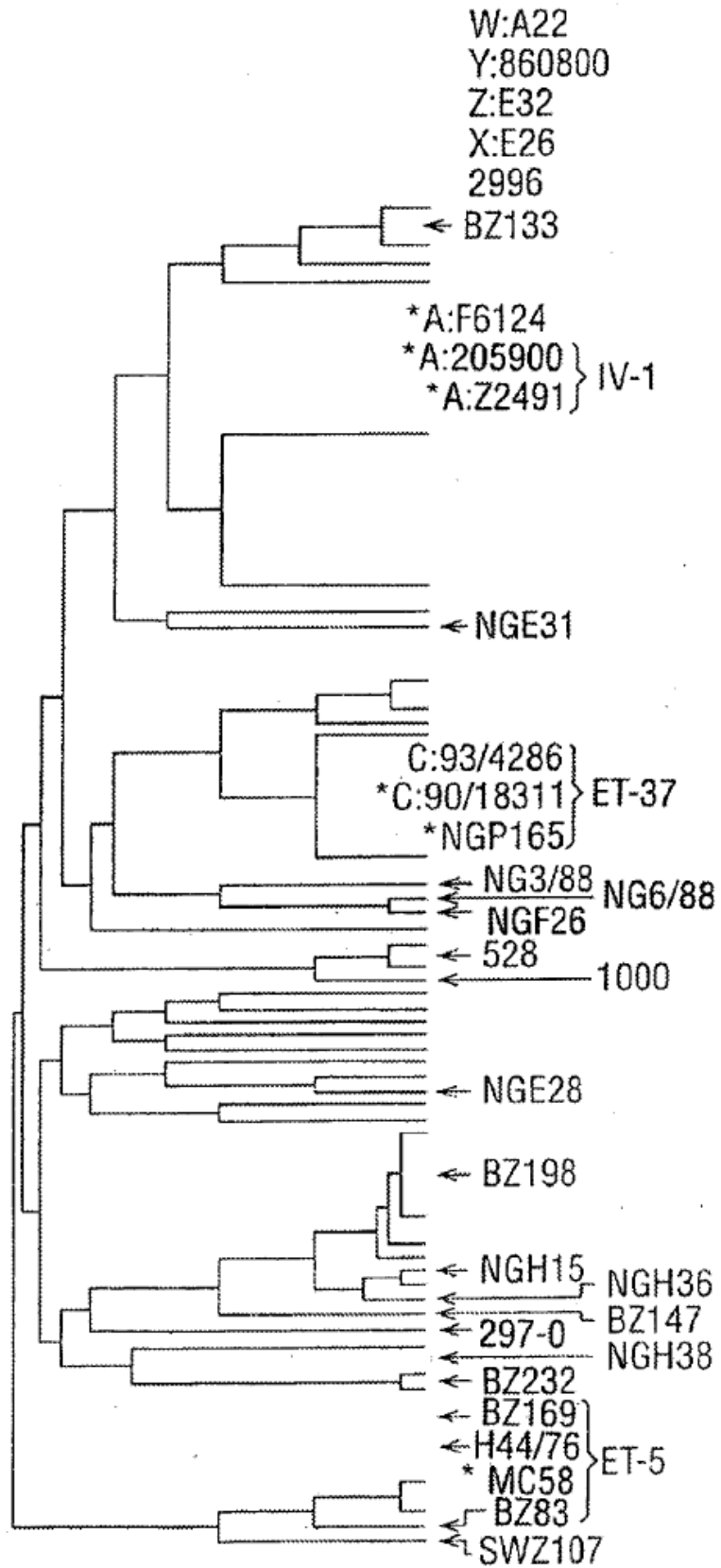


Figura 3

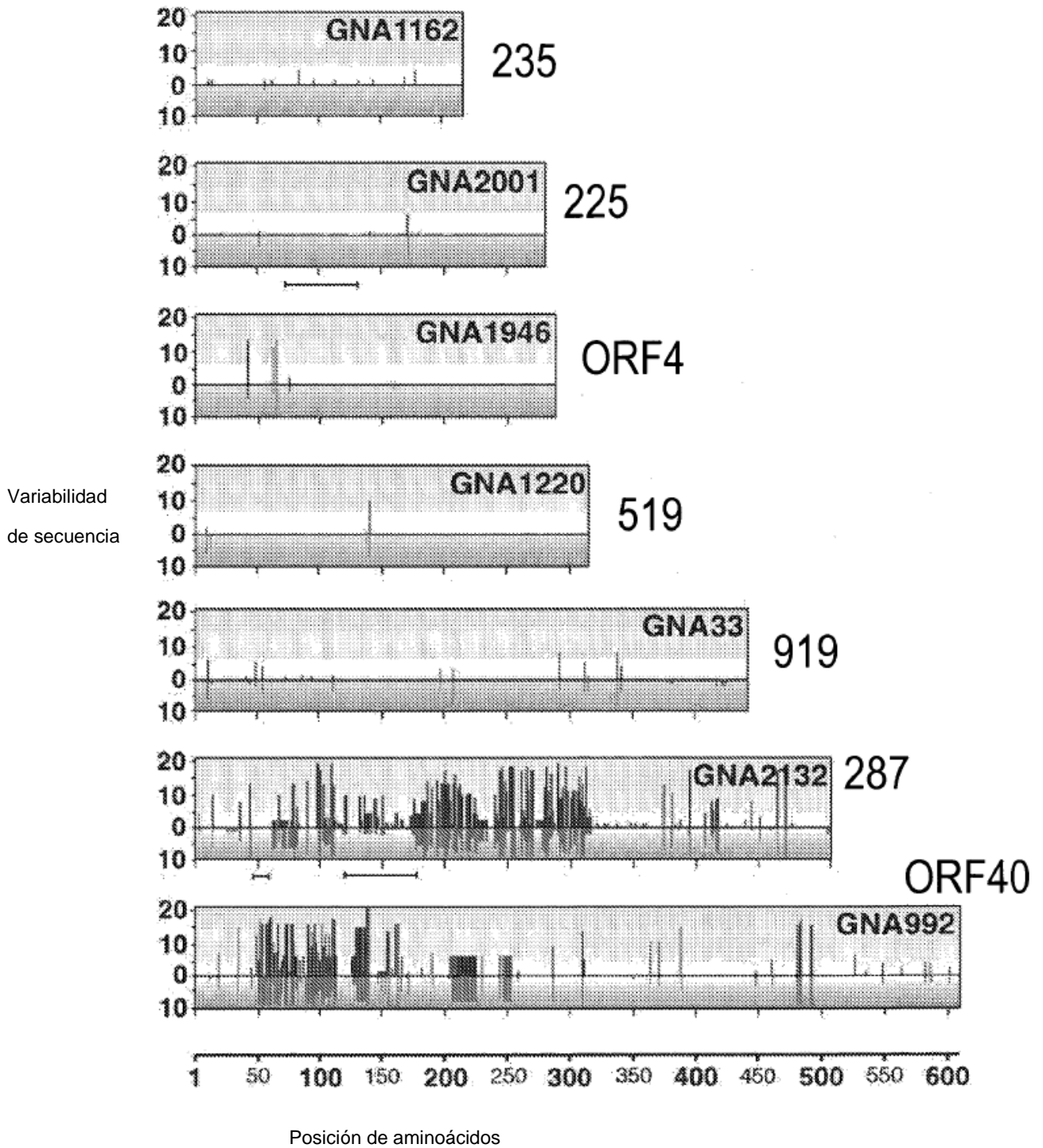


Figura 4

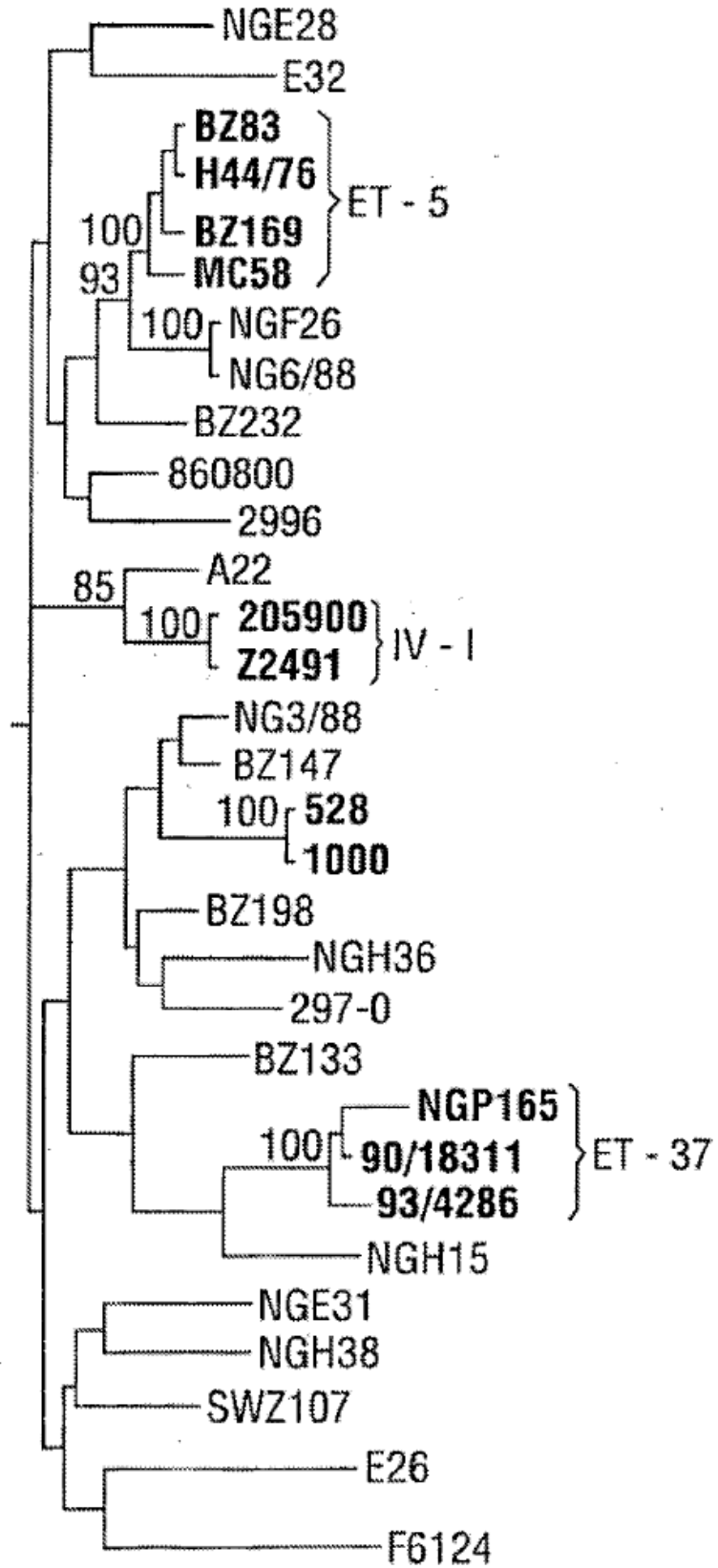


Figura 5 Cont.

2996	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
93-4286	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
BZ133	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
SWZ107	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
A22	50	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
E26	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TADNPN	DEGPPQNDMPQ	...
1000	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
528	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
E32	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NG6-88	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NGE31	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NGF26	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
860800	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NGH15	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
C11	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
BZ198	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NGH38	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSE	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
BZ169	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSE	ENTGNGGAA	TADNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
BZ83	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSE	ENTGNGGAA	TADNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
H44-76	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSE	ENTGNGGAA	TADNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
MC58	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSE	ENTGNGGAA	TADNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NG3-88	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSE	ENTGNGGAA	TADNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NGH36	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSE	ENTGNGGAA	TADNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
BZ147	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSE	ENTGNGGAA	TADNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NGE28	49	VKEDAPQAGS	QCGGAPSTQGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
FA1090	60	AAGGAPQADT	..QDATAGEGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
NG-F62	60	AAGGAPQADT	..QDATAGEGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPKNE	DEGPPQNDMPQ	...
205900	60	AVSGAPQADT	..QDATAGKGG	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPN	DEGPPQNDMPQ	...
90-18311	60	AVSGAPQADT	..QDATAGKGG	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPN	DEGPPQNDMPQ	...
NGP165	60	AVSGAPQADT	..QDATAGKGG	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPN	DEGPPQNDMPQ	...
Z2491	60	AVSGAPQADT	..QDATAGKGG	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPN	DEGPPQNDMPQ	...
F6124	60	AVSGAPQADT	..QDATAGKGG	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPN	DEGPPQNDMPQ	...
297-0	49	AKEDAPQAGS	QCGGAPSAQGG	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPN	DEGPPQNDMPQ	...
BZ232	60	AVSGAPQADT	..QDATAGKGG	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDNPN	DEGPPQNDMPQ	...
N_lactam	60	AVGGAPQADT	..QDATAGEGS	QDMAAVSA	ENTGNGGAA	TDDKPKNE	DEGPPQNDMPQ	...

Figura 5 Cont.

```

105 2996 .....M.....
105 93-4286 .....N.....
105 BZ133 .....N.....
105 SWZ107 .....N.....
106 A22 .....N.....
105 E26 .....N.....
105 1000 .....NAGNT
105 528 .....NAGNT
105 E32 .....NAGNT
105 NG6-88 .....NAGNT
105 NGE31 .....NAGNT
105 NGF26 .....NAGNT
105 860800 .....NAGNT
105 NGH15 .....N.....
105 C11 .....N.....
109 BZ198 TDSLTPNHHTPASNMPFAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMANQADGMQGGDDPSAGGENAGNT
109 NGH38 TDSLTPNHHTPASNMPFAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMANQADGMQGGDDPSAGGENAGNT
109 BZ169 TDSSTPNHHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSAGGQWAGNT
109 BZ83 TDSSTPNHHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSAGGQWAGNT
109 H44-76 TDSSTPNHHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSAGGQWAGNT
109 MC58 TDSSTPNHHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSAGGQWAGNT
109 NG3-88 TDSLTPNHHTPASNMPFAGNMENQAPDTGESVQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSAGGQWAGNT
109 NGH36 TDSLTPNHHTPASNMPFAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMANQADGMQGGDDPSAGGENAGNT
109 BZ147 TDSLTPNHHTPAPNMPFAGNMENQATDAGESEQPANQPDMANQADGMQGGDDPSAGGENAGNT
109 NGE28 TDSLTPNHHTPAPNMPFGDMGNQAPDYGESAQPENQPDANAGDGIQGGDDPSAGGENAGNT
117 FA1090 .....
117 NG-F62 .....
118 205900 TDSSTPNHHTPAPNMPTRDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSA.GENAGNT
118 90-18311 TDSSTPNHHTPAPNMPTRDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSA.GENAGNT
118 NGP165 TDSSTPNHHTPAPNMPTRDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSA.GENAGNT
118 Z2491 TDSSTPNHHTPAPNMPTRDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSA.GENAGNT
118 F6124 TDSSTPNHHTPAPNMPTRDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSA.GENAGNT
109 297-0 TDSSTPNHHTPAPNMPTRDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSA.GENAGNT
118 BZ232 TDSSTPNHHTPAPNMPTRDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSV.GENAGNT
118 N_lactam TDSLTPNYTTAFNMPAVDMGNQAPDAGESAQPANQPDMANAADMGMQGGDDPSV.GENAGNT

```


Figura 5 Cont.

2996	SCNGDNLL	DEEAPS	KSEFE	NDNES	SERIE	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
93-4286	SCNGDNLL	DEEAPS	KSEFE	NDNES	SERIE	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
BZ133	SCNGDNLL	DEEAPS	KSEFE	NDNES	SERIE	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
SWZ107	SCNGDNLL	DEEAPS	KSEFE	NDNES	SERIE	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
A22	SCNGDNLL	DEEAPS	KSEFE	NDNES	SERIE	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
E26	SCDGDNLL	DEEAPS	KSEFE	NDSES	ERM	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
1000	SCNGDNLL	SEERAP	KSEFE	QSD	EDK	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
528	SCNGDNLL	SEERAP	KSEFE	QSD	EDK	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
E32	SCNGDNLL	SEERAP	KSEFE	QSD	EDK	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
NG6-88	SCNGDNLL	SEERAP	KSEFE	QSD	EDK	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
NGE31	SCNGDNLL	SEERAP	KSEFE	QSD	EDK	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
NGF26	SCNGDNLL	SEERAP	KSEFE	QSD	EDK	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
860800	SCNGDNLL	SEERAP	KSEFE	QSD	EDK	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
NGH15	SCNGDNLL	SEERAP	KSEFE	QSD	EDK	EKYYK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV	
C11	VCDRD.	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
BZ198	SCSGN	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
NGH38	SCSGN	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
BZ169	SCSGN	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
BZ83	SCSGN	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
H44-76	SCSGN	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
MC58	SCSGN	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
NG3-88	TVCGS	FLAEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
NGH36	TVCGS	FLAEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
BZ147	SCSGD	FLAEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
NGE28	SCNDD	FLAEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
FA1090	SCNGD	FLAEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
NG-F62	SCNGD	FLAEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
205900	VCDRD.	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
90-18311	VCDRD.	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
NGP165	VCDRD.	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
Z2491	VCDRD.	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
F6124	VCDRD.	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
297-0	VCDRD.	FLDEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
BZ232	SCDGD	FLAEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV
N_lactam	SCNDD	FLAEEAP	KSEFE	SLD	SGR	IN	YK	...	DGKSD	KFTNL	VATA	VQAN	GTN	KYYV

Figura 5 Cont.

2996	IIYKDKSA	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	222
93-4286	IIYKDKSA	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	222
BZ133	IIYKDKSA	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	222
SWZ107	IIYKDKSA	SSSFAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	222
A22	IIYKDKSA	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	223
E26	IFYKPKTSS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	222
1000	IFYKPKTSS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	223
528	IFYKPKTSS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	223
E32	IFYKPKTSS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	223
NG6-88	IFYKPKTSS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	223
NGE31	IFYKPKTSS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	223
NGF26	IFYKPKTSS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	223
860800	IFYKPKTSS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	223
NGH15	IFYTKKPT	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	221
C11	IIYKDKSASS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	220
BZ198	IFYKPKPTS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	289
NGH38	IFYKPKPTS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	289
BZ169	IFYKPKPTS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	285
BZ83	IFYKPKPTS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	285
H44-76	IFYKPKPTS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	285
MC58	IFYKPKPTS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	285
NG3-88	IIYKDKSTS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	283
NGH36	IIYKDKSTS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	283
BZ147	IIYTKPT	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	283
NGE28	IIYQAQPT	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	283
FA1090	IFYTKKPT	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	231
NG-F62	IFYTKKPT	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	231
205900	IIYKDKSASS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	292
90-18311	IIYKDKSASS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	292
NGP165	IIYKDKSASS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	292
Z2491	IIYKDKSASS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	292
F6124	IIYKDKSASS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	292
297-0	IIYKDKSASS	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	283
BZ232	IFYKPK	SSSSAR	RRSARR	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	293
N_lactam	IFY..T..DTP	TRSA	RRRSLP	AEMPLI	PVNOAD	TLIVD	GEAVS	LTGH	SGNIF	FAPE	292	

Figura 5 Cont.

2996	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
93-4286	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
BZ133	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
SWZ107	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
A22	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
E26	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
1000	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
528	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
E32	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NG5-88	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NGE31	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NGF26	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
860800	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NGH15	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
C11	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
BZ198	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NGH38	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
BZ169	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
BZ83	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
H44-76	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
MC58	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NG3-88	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NGH36	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
BZ147	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NGE28	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
FA1090	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NG-F62	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
205900	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
90-18311	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
NGP165	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
Z2491	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
F6124	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
297-0	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
BZ232	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA
N_lactam	GNRYLTYGAEKL	PGGSYALR	VQGEPAKGEMLAGTAVYNCEVLHFH	TENCRPY	TRGRFA

Figura 5 Cont.

2996	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
93-4286	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
BZ133	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
SWZ107	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
A22	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
E26	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
1000	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
528	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
E32	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NG6-88	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NGE31	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NGF26	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
860800	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NGH15	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
C11	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
BZ198	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NGH38	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
BZ169	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
BZ83	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
H44-76	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
MC58	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NG3-88	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NGH36	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
BZ147	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NGE28	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
PA1090	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NG-F62	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
205900	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
90-18311	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
NGP165	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
Z2491	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
F6124	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
297-0	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
BZ232	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV
N_lactam	AKVDFGSKSV	VDGI	IDS	GDDL	LHMGT	QKFKAA	IDGN	GFKG	TWT	ENGG	DDV	SGR	FYGP	AGEEV

Figura 5 Cont.

2996	402	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
93-4286	402	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
BZ133	402	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
SWZ107	402	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
A22	403	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
E26	400	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
1000	401	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
528	401	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
E32	401	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NG6-88	401	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NGE31	401	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NGF26	401	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
860800	401	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NGH15	394	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
C11	398	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
BZ198	467	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NGH38	467	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
BZ169	463	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
BZ83	463	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
H44-76	463	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
MC58	463	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NG3-88	461	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NGH36	461	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
BZ147	456	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NGE28	455	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
FA1090	404	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGK DR D
NG-F62	404	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGK DR D
205900	472	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
90-18311	472	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
NGP165	472	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
Z2491	472	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
F6124	472	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
297-0	463	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
BZ232	471	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD
N_lactam	468	AGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD