

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 946**

51 Int. Cl.:

C07K 14/22 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009 E 09713537 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2245048**

54 Título: **Polipéptidos PUfH meningocócicos**

30 Prioridad:

21.02.2008 US 66711

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

06.04.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**PIZZA, MARIAGRAZIA;
SCARSELLI, MARIA;
GIULIANI, MARZIA MONICA;
ARICO, MARIA y
RAPPUOLI, RINO**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 532 946 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).

Polipéptidos PUfH meningocócicos**Descripción****5 Campo técnico**

La invención está en el campo de inmunización y, en particular, inmunización contra enfermedades causadas por bacterias patogénicas en el género *Neisseria*, tales como *N. meningitidis* (meningococo).

10 Técnica anterior

Neisseria meningitidis es una bacteria Gram negativa encapsulada que coloniza el tracto respiratorio superior de aproximadamente 10% de la población humana. Aunque las vacunas de polisacárido y conjugados están disponibles contra los serogrupos A, C, W135 e Y, esta técnica no puede aplicarse al serogrupo B porque el polisacárido capsular es un polímero de ácido polisialílico, que es una autoantígeno en humanos. Para desarrollar una vacuna contra el serogrupo B, se han usado proteínas expuestas a la superficie contenidas en las vesículas de membrana externa (VME). Estas vacunas obtienen respuestas de anticuerpo bactericida del suero y protegen contra la enfermedad, pero fallan al inducir protección de cepa cruzada [1]. Por lo tanto, algunos trabajadores se están centrando en antígenos meningocócicos específicos para su uso en vacunas [2].

Tal antígenos es la proteínas de unión al factor H (PUfH) meningocócica, también conocida como proteína "741", [SEQ IDs 2535 & 2536 en ref. 3; SEQ ID 1 aquí], "NMB1870" [refs. 4-6, siguiente ref. 2], "P2086", "LP2086" u "ORF2086" [7-9]. Esta lipoproteína se expresa en todos los grupos meningocócicos y se ha encontrado en múltiples cepas meningocócicas. Las secuencias de PUfH se han agrupado en tres familias [4] (aquí referidas como familias I, II y III), y se ha descubierto que el suero provocado contra una familia dada es bactericida en la misma familia, pero no es activo contra cepas que expresan una de las otras dos familias, esto es, hay una protección cruzada intra-familiar, pero no hay protección cruzada inter-familiar.

Para conseguir protección de cepa cruzada usando PUfH, por lo tanto, puede usarse más de una familia. Para evitar la necesidad de expresar y purificar proteínas separadas, se ha propuesto expresar diferentes familias como proteínas híbridas [10-12], incluyendo dos o tres de las familias en una única cadena polipeptídica. Las referencias 13 y 14 describen varias técnicas basadas en mutagénesis para modificar secuencias de PUfH para aumentar su cobertura en las familias I, II y III.

Es un objeto de la invención proporcionar técnicas adicionales y mejoradas para superar la especificidad familiar de protección ofrecida por PUfH, y usar estas técnicas para proporcionar inmunidad contra enfermedad y/o infección meningocócica, particularmente para serogrupo B.

40 Divulgación de la invención

PUfH de longitud completa tiene la siguiente secuencia de aminoácido (SEQ ID NO: 1) en cepa MC58:

```

45 MNRTAFCCSLTTLALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLEK
LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQ
IQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIA GEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQNGG
KIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNG
IRHIGLAAKQ

```

50 La lipoproteína madura carece de los primeros 19 aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la forma ΔG de PUfH carece de los primeros 26 aminoácidos.

La secuencia MC58 (SEQ ID NO: 1) es una familia PUfH. Los anticuerpos obtenidos usando la secuencia MC58 tienen una alta actividad bactericida contra la cepa MC58, pero tienen una actividad mucho más baja contra cepas que expresan una familia I o II PUfH. En algunas realizaciones la invención se refiere a formas modificadas de PUfH, donde la modificación o las modificaciones mejorar la habilidad de la proteína para obtener anticuerpos bactericidas de familia cruzada. En otras realizaciones la invención se refiere a formas de PUfH que de manera natural obtienen anticuerpos bactericida de familia cruzada.

60 Así, la invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido. Esta secuencia de aminoácido comienza en el residuo que corresponde a Val-27 de la secuencia MC58 pero incluye varias modificaciones de aminoácido en los sitios corriente abajo.

65 Los polipéptidos tienen la habilidad de incluir anticuerpos bactericidas anti-meningocócicos después de su administración a un animal huésped, y es realizaciones preferentes pueden inducir anticuerpos que son bactericidas

contra cepas en cada una de las tres familias I a III de PUfH. Más abajo se da más información sobre respuestas bactericidas.

Polipéptidos

5 Los polipéptidos de la invención pueden prepararse mediante varios medios, por ejemplo, mediante síntesis química (al menos en parte), digiriendo polipéptidos más largos usando proteasas, mediante traslación de ARN, mediante purificación de cultivo celular (por ejemplo, de expresión recombinante o de cultivo de *N. meningitidis*), etc. La expresión heteróloga en un huésped *E. coli* es una ruta preferente de expresión.

10 PUfH es naturalmente una proteína en *N. meningitidis*. También se ha descubierto que se convierte en lípico cuando se expresa en *E. coli* con su secuencia líder nativa. Los polipéptidos de la invención pueden tener un residuo de cisteína en terminal N, que puede convertirse en lípido, por ejemplo, comprendiendo un grupo palmitoilo, normalmente formando una tripalmitoilo-S-gliceril-cisteína. En otras realizaciones los polipéptidos no se convierten en lípidos.

15 Una característica de polipéptidos preferentes de la invención es la habilidad para inducir anticuerpos bactericidas anti-meningocócicos después de su administración a un animal huésped.

20 Los polipéptidos se preparan preferentemente en forma sustancialmente pura o en forma sustancialmente aislada (esto es, sustancialmente libres de otros polipéptidos de Neisseria o de célula huésped) o en forma sustancialmente aislada. En general, los polipéptidos se proporcionan en un medio que ocurre de manera no natural, por ejemplo, se separan de su medio que ocurre de manera natural. En ciertas realizaciones, el polipéptido sujeto está presente en una composición que está enriquecida para el polipéptido en comparación con un control. Así, se proporciona un polipéptido purificado, y por purificado se entiende que el polipéptido está presente en una composición que está sustancialmente libre de otros polipéptidos expresados, donde por sustancialmente libre se entiende que menos del 90%, normalmente menos del 60% y más normalmente menos del 50% de la composición está formada por otros polipéptidos expresados.

30 Los polipéptidos pueden tomar varias formas (por ejemplo, nativos, fusiones, glicosilados, no glicosilados, convertidos en lípidos, puentes de disulfuro, etc.).

35 Las SEQ ID Nos 4 a 76 no incluyen metionina de terminal N. Si un polipéptido de la invención se produce mediante traslación en un huésped biológico entonces se requiere un codón de inicio, que proporcionará una metionina de terminal N en la mayoría de los huéspedes. Así, un polipéptido de la invención incluirá, al menos en una fase naciente, un residuo de metionina corriente arriba de dicha secuencia SEQ ID NO.

40 En algunas realizaciones el polipéptido tiene una única metionina en la terminal N inmediatamente seguida por la secuencia SEQ ID NO; en otras realizaciones puede usarse una secuencia corriente arriba más larga. Tal secuencia corriente arriba puede ser corta (por ejemplo, 40 o menos aminoácidos, esto es, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos incluyen secuencias líderes para dirigir proteínas circulantes, o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (Por ejemplo, etiquetas de histidina, esto es, His_n donde n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácido de terminal N adecuadas serán aparentes para aquellos expertos en la técnica.

45 Un polipéptido de la invención también puede incluir aminoácidos corriente abajo del aminoácido final de las secuencias SEQ ID NO. Tales extensiones pueden ser cortas (por ejemplo, 40 o menos aminoácidos, esto es, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos incluyen secuencias líderes para dirigir proteínas circulantes, secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (Por ejemplo, etiquetas de histidina, esto es, His_n donde n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), o secuencias que mejoran la estabilidad del polipéptido. Otras secuencias de aminoácido de terminal C adecuadas serán aparentes para aquellos expertos en la técnica.

50 El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácido de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no-aminoácidos. Los términos también incluyen un polímero de aminoácido que se ha modificado de manera natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, transformación en lípido, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácido no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

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

60

65

Los polipéptidos de la invención pueden comprender una etiqueta detectable, por ejemplo, una etiqueta radioactiva, una etiqueta fluorescente o una etiqueta de biotina. Esto es particularmente útil en técnicas de inmunoensayo.

5 Como se desvela en la referencia 13, PUFH puede dividirse en tres dominios, referidos como A, B y C. Tomando SEQ ID NO: 1, los tres dominios son (A) 1-119, (B) 120-183 y (C) 184-274.

10 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLK
 LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQ
IQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNQ
 KIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNG
 IRHIGLAAKQ

15 La forma madura del dominio "A", desde Cis-20 en su terminal N a Lis-119, se llama "A_{maduro}".

20 Se conocen múltiples secuencias PUFH y estas pueden alinearse fácilmente usando métodos estándares. Mediante tal alineamiento la persona experta puede identificar (a) dominios "A" (y "A_{maduro}"), "B" y "C", en cualquier secuencia PUFH dada mediante comparación con las coordenadas en la secuencia MC58, y (b) residuos sencillos en secuencias PUFH múltiples, por ejemplo, identificando sustituciones. Sin embargo, para facilitar la referencia, los dominios se definen más abajo:

25 - Dominio "A" en una secuencia PUFH dada es el fragmento de esa secuencia que, cuando se alinea con SEQ ID NO: 1 usando un algoritmo de alineamiento por pares, comienza con el aminoácido alineado con Met-1 de SEQ ID NO: 1 y acaba con el aminoácido alineado con Lis-119 de SEQ ID NO: 1.

30 - Dominio "A_{maduro}" en una secuencia PUFH dada es el fragmento de esa secuencia que, cuando se alinea con SEQ ID NO: 1 usando un algoritmo de alineamiento por pares, comienza con el aminoácido alineado con Cis-20 de SEQ ID NO: 1 y acaba con el aminoácido alineado con Lis-119 de SEQ ID NO: 1.

35 - Dominio "B" en una secuencia PUFH dada es el fragmento de esa secuencia que, cuando se alinea con SEQ ID NO: 1 usando un algoritmo de alineamiento por pares, comienza con el aminoácido alineado con Gln-120 de SEQ ID NO: 1 y acaba con el aminoácido alineado con Gli-183 de SEQ ID NO: 1.

40 - Dominio "C" en una secuencia PUFH dada es el fragmento de esa secuencia que, cuando se alinea con SEQ ID NO: 1 usando un algoritmo de alineamiento por pares, comienza con el aminoácido alineado con Lis-184 de SEQ ID NO: 1 y acaba con el aminoácido alineado con Gli-274 de SEQ ID NO: 1.

45 El algoritmo de alineamiento por pares preferente para definir los dominios es el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch [15], usando parámetros estándares (por ejemplo, con penalización de abertura de hueco = 10,0, y con penalización de extensión de hueco = 0,5, usando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo está convenientemente implementado en la herramienta *needle* en el paquete EMBOSS [16].

50 En algunas realizaciones, un polipéptido de la invención está truncada para eliminar su dominio A, esto es, el dominio A se omite de una SEQ ID.

Ácidos nucleicos

55 La invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención como se define en las reivindicaciones.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse de muchas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química (por ejemplo, síntesis fosforamídita de ADN) en su totalidad o en parte, digiriendo ácidos nucleicos más largos usando nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), uniendo ácidos nucleicos más cortos o nucleótidos (por ejemplo, usando ligasas o polimerasas), de bibliotecas genómicas o ADN, etc.

60 Los ácidos nucleicos de la invención pueden tomar varias formas, por ejemplo, con una única hélice, con doble hélice, vectores, cebadores, sondas, etiquetados, no etiquetados, etc.

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

65 Los términos "ácido nucleico" incluyen ADN y ARN, y también sus análogos, como aquellos que contienen segmentos principales modificados, y también ácido nucleicos peptídicos (APN), etc.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede estar etiquetado, por ejemplo, con una etiqueta radioactiva o fluorescente.

5 La invención también proporciona vectores (tales como plásmidos) que comprenden secuencias de nucleótido de la invención (por ejemplo, vectores de clonación o expresión, como aquellos adecuados para inmunización de ácido nucleico) y células huéspedes transformadas con tales vectores.

Respuestas bactericidas

10 Los polipéptidos preferentes de la invención pueden obtener respuestas de anticuerpo contra meningococos. Las respuestas bactericidas de anticuerpo se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de eficacia de vacuna [por ejemplo, véase nota final 14 y referencia 2]. Los polipéptidos de la invención pueden preferentemente obtener una respuesta de anticuerpo que es bacteriana contra al menos una cepa de *N. meningitidis* para cada uno de al menos dos de los siguientes tres grupos de cepas:

15 (I) MC58, gb185 (=M01-240185), m4030, m2197, m2937, iss1001, NZ394/98, 67/00, 93/114, bz198, m1390, nge28, lnp17592, 00-241341, f6124, 205900, m198/172, bz133, gb149 (=M01-240149), nm008, nm092, 30/00, 39/99, 72/00, 95330, bz169, 20 bz83, cu385, h44/76, m1590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44/89, 14847.

(II) 961-5945, 2996, 96217, 312294, 11327, a22, gb013 (=M01-240013), e32, m1090, 25 m4287, 860800, 599, 95N477, 90-18311, c11, m986, m2671, 1000, m1096, m3279, bz232, dk353, m3697, ngh38, L93/4286.

(III) M1239, 16889, gb355 (=M01-240355), m3369, m3813, ngp165.

30 Por ejemplo, un polipéptido puede obtener una respuesta bactericida efectiva contra dos o tres de las cepas MC58, 961-5945 y M1239 de *N. meningitidis* serogrupo B.

35 El polipéptido puede obtener preferentemente una respuesta de anticuerpo que es bactericida contra al menos 50% de cepas meningocócicas serogrupo B clínicamente relevantes (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más). El polipéptido puede obtener una respuestas de anticuerpo que es bactericida contra cepas de *N. meningitidis* serogrupo B y capas de al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) de serogrupos A, C, W135 e Y. el polipéptido puede obtener una respuesta de anticuerpo que es bactericida contra cepas de *N. gonorrhoeae* y/o *N. cinerea*. El polipéptido puede obtener una respuesta que es bactericida contra cepas de al menos dos de las tres ramas principales del dendrograma mostrado en la Figura 5 de referencia 4.

40 El polipéptido puede obtener una respuesta de anticuerpo que es bactericida contra cepas de *N. meningitidis* en al menos 2 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7) de linajes hipervirulentos ET-37, ET-5, grupo A4, linaje 3, subgrupo I, subgrupo III y subgrupo IV-1 [17,18]. Los polipéptidos pueden además inducir respuestas bactericidas de anticuerpo contra uno o más linajes hiperinvasivos.

45 Los polipéptidos pueden obtener una respuesta de anticuerpo que es bactericida contra cepas de *N. meningitidis* en al menos 2 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7) de los siguientes tipos multilocus de secuencia: ST1, ST4, ST5, ST8, ST11, ST32 y ST41 [19]. El polipéptido puede también obtener una respuesta de anticuerpo que es bactericida contra cepas ST44.

50 El polipéptido no necesita inducir anticuerpos bactericidas contra todas las cepas MenB en los linajes especificados o MLST; más bien, para un grupo dado de cuatro o más cepas de meningococo serogrupo B en un linaje hipervirulento particular o MLST, lo anticuerpos inducidos por la composición son preferentemente bactericidas contra al menos 50% (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos preferentes de cepas incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. El suero preferentemente tiene un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o mayor, preferentemente al menos 2^{10}), esto es, el suero es capaz de matar al menos 50% de bacterias de prueba de una cepa particular cuando se diluye 1:1024, por ejemplo, como se describe en la nota final 14 de referencia 2. Los polipéptidos químicos preferentes pueden obtener una respuesta de anticuerpo en ratones que permanece bactericida incluso cuando el suero se diluye 1:4096 o más.

Inmunización

60 Los polipéptidos de la invención pueden usarse como el principio activo de composiciones inmunogénicas, y así la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de la invención.

65

Aquí también se desvela un método para provocar una respuesta de anticuerpo en un mamífero, que comprende la administración de una composición inmunogénica de la invención a un mamífero. La respuesta de anticuerpo es preferentemente una respuesta de anticuerpo protectora y/o bactericida. La invención también proporciona polipéptidos de la invención para su uso en tales métodos.

5 Aquí también se desvela un método para proteger un mamífero contra una infección de *Neisseria* (por ejemplo, meningocócica), que comprende la administración al mamífero de una composición inmunogénica de la invención.

10 La invención proporciona polipéptidos de la invención para su uso como medicamentos (por ejemplo, como composiciones inmunogénicas o como vacunas) o como reactivos de diagnóstico. También proporciona el uso de ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir infección de *Neisseria* (por ejemplo, meningocócica) en un mamífero.

15 El mamífero es preferentemente un humano. El humano puede ser un adulto o, preferentemente, un niño. Donde la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño de 1 a 7 años); donde la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferentemente un adulto. Una vacuna que será para niños puede también administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

20 Los usos y métodos son particularmente útiles para prevenir/tratar enfermedades incluyendo, pero sin limitar, meningitis (particularmente bacteriana, tal como meningitis meningocócica) y bacteremia.

25 La eficacia del tratamiento terapéutico puede analizarse controlando la infección por *Neisseria* después de la administración de la composición de la invención. La eficacia del tratamiento profiláctico puede analizarse controlando respuesta inmunes contra PUfH después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse administrándolas a sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad o modelos animales [20]) y después determinando parámetros estándares que incluyen anticuerpos bactericidas del suero (ABS) y títulos ELISA (GMT). Estas respuestas inmunes se determinarán generalmente alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán con valores determinados antes de la administración de la composición. Un aumento de ABS de al menos 4 veces u 8 veces es preferente. Donde se administras más de una dosis de la composición, puede hacerse más de una determinación post-administración.

35 Las composiciones preferentes de la invención pueden conferir un título de anticuerpo en un paciente que sea superior al criterio para seroprotección de cada componente antigénico para una porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con una título de anticuerpo asociado por encima del cual un huésped se considera que se seroconvertirá contra el antígeno son bien conocidos, y tales títulos los publican organizaciones tales como OMS. Preferentemente más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos se seroconvierte, más preferentemente más del 90%, aún más preferentemente más del 93% y más preferentemente 96-100%.

40 Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede realizarse mediante inyección parenteral (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente o al espacio intersticial de un tejido), o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración mediante mucosa. La administración intramuscular al muslo o a la parte superior del brazo es preferente. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección libre de aguja. Una dosis intramuscular típica es aproximadamente 0,5 ml.

50 La invención puede usarse para obtener inmunidad sistémica y/o de mucosa.

El tratamiento con dosis puede ser un programa con una única dosis o un programa con dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de inmunización primaria puede estar seguido por un programa de dosis de refuerzo. El cálculo adecuado de la duración entre las dosis de preparación (por ejemplo, entre 4-16 semanas) y entre la preparación y el refuerzo pueden determinarse de manera rutinaria.

55 La composición inmunogénica de la invención generalmente incluirá un transportador farmacéuticamente aceptable, que puede ser cualquier sustancia que por sí misma no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el paciente que recibe la composición, y que puede administrarse sin toxicidad indebida. Los transportadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes y emulsionantes, sustancias amortiguadoras de pH y similares también pueden estar presentes en tales vehículos. Una exposición profunda de transportadores adecuados está disponible en ref. 21.

65

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

La composición es preferentemente estéril. Está preferentemente libre de pirógeno. Está preferentemente amortiguada, por ejemplo, entre pH 6 y pH 8, generalmente alrededor de pH 7. Donde una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, es preferente usar un tampón de histidina [22]. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a humanos.

Las composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de inmunógeno, así como cualquier otro componente especificado. Por "cantidad inmunológicamente efectiva" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una única dosis o como parte de una serie, es efectiva para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que se tratará, edad, grupo taxonómico del individuo que se tratará (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado deseado de protección, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica del doctor que está tratando y otros factores relevante. Se espera que la cantidad corresponda a un rango relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios. El tratamiento con dosis puede ser un programa de una única dosis o un programa con dosis múltiples (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo). La composición puede administrarse junto con otros agentes inmunoreguladores.

Los adyuvantes que pueden usarse en composiciones de la invención incluyen, aunque no se limitan a:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales para su uso como adyuvante en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véase capítulos 8 y 9 de ref. 23] o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y siendo preferente la adsorción. Las composiciones que contienen minerales pueden también formularse como una partícula de sal metálica [24]

Un adyuvante de fosfato de aluminio útil es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluido en 0,6 mg Al_3^+/ml .

B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno en agua, tal como MF59 [Capítulo 10 de ref. 23; veas también ref. 25] (5% Escualeno, 0,5% Tween 80 y 0,5% Span 85, formulado en partículas submicrón usando un microfluidizador). También pueden usarse adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF).

Las emulsiones útiles de aceite en agua incluyen al menos un aceite y al menos un surfactante, siendo los aceites y surfactantes biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente inferiores a 1 μm en diámetro, consiguiéndose estos tamaños pequeños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Las gotitas con un tamaño inferior a 220nm son preferentes ya que pueden someterse a esterilización con filtro.

La emulsión puede comprender aceites tales como aquellos procedentes de una fuente animal (tal como un pescado) o fuente vegetal. Las fuentes para aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. Aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, comúnmente los más disponibles, ejemplifican los aceites de frutos secos. Puede usarse aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de la vaina de jojoba. Aceites de semillas incluyen aceite de alazor, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero el aceite de otros cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticale y similares también pueden usarse. Ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, mientras no ocurran de manera natural en aceites de semillas, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de aceites de frutos secos y semillas. Las grasas y aceites de leche de mamífero pueden metabolizarse y por lo tanto pueden usarse en la práctica de esta invención. Los procedimientos para separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los pescados contienen aceites que pueden metabolizarse que pueden reconvertirse fácilmente. Por ejemplo, aceite

de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceites de ballena tal como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescado que pueden usarse aquí. Un número de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y generalmente se refieren como terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado, no saturado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracohehexano, que aquí es particularmente preferente. Escualano, el análogo saturado a escualeno, es también un aceite preferente. Los aceites de pescados, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles en fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. Otros aceites preferentes son los tocoferoles (véase más abajo). Pueden usarse mezclas de aceites.

Los surfactante pueden clasificarse por su "EHL" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los surfactantes preferentes de la invención tienen un EHL de al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 16. La invención puede usarse con surfactantes que incluyen, aunque no se limitan a: surfactantes de ésteres de sorbitan polioxietileno (comúnmente referidos como Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) y/u óxido de butileno (OB), vendido bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como polímeros en bloque lineales OE/OP; octosinoles, que pueden variar en el número de grupos repetitivos de etoxi (oxi-1,2-etanodil), con octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol) siendo de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidicolina (lecitina); nonilfenol etoxilatos, tales como serie Tergitol™NP; ésteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de lauril, cetil, estearil y oleil (conocidos como surfactantes Brij), tales como monolauril éter de trietilenoglicol (Brij 30); y ésteres sorbitán (comúnmente conocidos como SPANs), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los surfactantes no iónicos son preferentes. Los surfactantes preferentes para incluir en la emulsión son Tween 80 (polioxietileno monooleato de sorbitán), Span (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Pueden usarse mezclas de surfactantes, por ejemplo mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de sorbitán de polioxietileno tal como polioxietileno monooleato de sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) es también adecuado. Otra combinación útil comprende laureth 9 más éster de sorbitán de polioxietileno y/o un octoxinol.

Las cantidades preferentes de surfactantes (% por peso) son: ésteres de sorbitán de polioxietileno (tales como Tween 80) 0,01, a 1% en particular aproximadamente 0,1%; octil- o nonilfenoxi polioxietanolese (tales como Triton X-100 u otros detergentes en la serie Triton) 0,001 a 0,1%, en particular 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 20%, preferentemente 0,1 a 10% y en particular 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5%.

Preferentemente, sustancialmente todas (por ejemplo, al menos 90% por número) las gotitas de aceite tienen un diámetro inferior a 1 µm, por ejemplo, ≤750nm, ≤500nm, ≤400nm, ≤300nm, ≤250nm, ≤220nm, ≤200nm o más pequeños.

Una emulsión de escualeno de submicrón específica útil, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión por volumen puede ser aproximadamente 5% escualeno, aproximadamente 0,5% polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% Span 85. En términos de peso, estas proporciones se convierten en 4,3% escualeno, 0,5% polisorbato 80 y 0,48% Span 85. Este adyuvante es conocido como "MF59" [26-28], como se describe con más detalles en el Capítulo 10 de ref. 29 y capítulo 12 de ref. 30. La emulsión de MF59 incluye ventajosamente iones, por ejemplo, 10mM de tampón de citrato de sodio.

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de ref. 23]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterogéneos de glicósidos esteroideos y glicósidos triterpénicos que se encuentran en el tronco, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia variedad de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria molina* se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también puede obtenerse en el mercado de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officianalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lípidas, tales como ISCOMs. QS21 se vende como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificación usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas que usan estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se desvela en ref. 31. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroide, tal como colesterol [32].

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 de ref. 23]. Los ISCOMs típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede usarse en ISCOMs. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOMs se describen con más detalle en las refs. 32-34. Opcionalmente, los ISCOMs pueden estar libres de detergente adicional [35].

En las refs. 36 y 37 puede encontrarse un análisis del desarrollo de adyuvantes basados en saponina.

D. Virosomas y partículas tipo virus

5 Los virosomas y las partículas tipo virus (PTV) también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Son generalmente no patogénicos, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas virales nativos. Las proteínas virales pueden producirse de manera recombinante o aislarse de los virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o PTV incluyen proteínas derivadas de virus de gripe (tal como HA o NA), virus de Hepatitis B (tal como proteínas núcleo o cápsidas), virus de Hepatitis E, virus de sarampión, virus de Sindbis, virus de enfermedad de pies y manos, retrovirus, virus de Norwalk, virus de papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fagos Q β (tales como proteínas de cabra), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como retrotransposón Ty proteína p1). Los PTV se analizan con más detalle en las refs. 38-43. Los virosomas se analizan con más detalle, por ejemplo, en la ref. 44.

15

E. Derivados bacterianos o microbiales

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbiales tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados de Lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas ribosilantes ADP y derivados desintoxicados de los mismos.

20

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen un monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-deacilado (3dMPL). 3dLMF es una mezcla de monofosforil lípido A 3 de-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una "partícula pequeña" preferente de monofosforil lípido A 3 de-O-acilado se desvela en la ref. 45. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para filtrarse estériles a través de una membrana de 0,22 μ m [45]. Otros derivados LPS no tóxicos incluyen imitadores de monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529 [46, 47]

25

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en las refs. 48 y 49.

30

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótido que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleótido que contiene una citosina no metilada unida por un enlace de fosfato a una guanosina). Los ARN de doble hélice y oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también han demostrado ser inmunoestimulantes.

35

CpGs pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótido tales como modificaciones de fosforotioato y pueden tener dos o una hélice. Las referencias 50, 51 y 52 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo, sustitución de guanosina por 2'-deoxi-7-deazaguanosina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se analiza con más detalle en las refs. 53-58.

40

La secuencia CpG puede estar dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [59]. La secuencia CpG pueden ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como CpG-A ODN o puede ser más específica para inducir una respuesta de célula B tal como CpG-B ODN. ODNs CpG-A y CpG-B se analizan en las refs. 60-62. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A.

45

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye para que el extremo 5' sea accesible para la reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótido CpG pueden estar unidas en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, refs. 59 y 63-65.

50

Una adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimulantes es conocido como IC31TM [66]. Así, un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) incluyendo al menos un (y preferentemente múltiples) motivo Cpl (esto es, citosina unida a una inosina para formar un dinucleótido), y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) incluyendo al menos una (y preferentemente múltiple) secuencia tripeptídica Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un deoxinucleótido que comprende secuencia de 26 unidades méricas 5'-(IC)13-3' (SEQ ID NO: 81). El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprende secuencia de aminoácido de 11 unidades méricas KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 82).

55

Las toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvante en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ADP-ribosilantes desintoxicadas como adyuvantes de mucosa se describe en ref. 67 y como adyuvantes parenterales en ref. 68. La toxina o toxoide está preferentemente en forma de una holotoxina, comprendiendo subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y derivados desintoxicados

60

65

de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las refs 69-76. Un mutante CT útil es o CT-E29H [77]. Las referencia numérica para sustituciones de aminoácido se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ADP-ribosilantes expuestas en la ref. 78.

5 E. Inmunomodulares humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citoquinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [79], etc.) [80], interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulador de colonia de macrófagos y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferentes es IL-12.

10 G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos pueden también usarse como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas esterificadas de ácido hialurónico [81] o mucoadhesivos tales como derivados de enlace cruzado de ácido poliacrílico, alcohol de polivinilo, pirrolidona de polivinilo, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y derivados del mismo también pueden usarse como adyuvantes en la invención [82].

20 H. Micropartículas

Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (esto es, una partícula de ~100nm a ~150 μ m en diámetro, más preferentemente de ~200nm a ~30 μ m en diámetro, y más preferentemente de ~500nm a ~10 μ m en diámetro) formados a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un ácido poli(α -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc), con poli(láctido-co-glicólidos) siendo preferentes, opcionalmente tratados para tener una superficie con carga negativa (por ejemplo, con SDS) o una superficie con carga positiva (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

30 I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de ref. 23)

Ejemplos de formulaciones de liposoma adecuados para su uso como adyuvantes se describen en las refs. 83-85.

35 J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [86]. Tales formulaciones pueden además incluir surfactantes de éster de sorbitán de polioxietileno en combinación con un octoxinol [87] así como éteres de alquilo de polioxietileno o surfactantes de ésteres en combinación con al menos un surfactante adicional no iónico tal como octoxinol [88]. Los éteres de polioxietileno preferentes se seleccionan del siguiente grupo: éter de polioxietileno-9-lauril (laureth 9), éter de polioxietileno-9-eteoril, éter de polioxietileno-8-eteoril, éter de polioxietileno-4-lauril, éter de polioxietileno-35-lauril y éter de polioxietileno-23-lauril.

45 K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones PCPP se describen, por ejemplo, en las refs. 89 y 90.

50 L. Péptidos de muramilo

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

55 M. Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo "Resiquimod 3M", descritos con más detalle en las refs. 91 y 92.

La invención comprende además combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, en la invención pueden usarse las siguientes composiciones de adyuvantes: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [93]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL [94]; (3) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un estero) [95]; (5) una combinación de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [96]; (6) SAF, que contiene 6% escualano, 0,4% Tween 80TM, 5% polímero en bloque plurónico L121, y thr-MDP, bien microfluidizado o

en una emulsión submicrón o sometido a vórtice para generar una emulsión con un tamaño más grande de partícula. (7) Sistema adyuvante Ribi™ (SAR), (Ribi Immunochem) que contiene 2% escualeno, 0,2% Tween 80 y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo consistente en monofosforilípido A (MFL), trehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de pared celular (EPC), preferentemente MFL + EPC (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de ref. 23.

El uso de hidróxido de aluminio y/o adyuvantes de fosfato de aluminio es particularmente preferente, y los antígenos generalmente se adsorben a estas sales. Otras combinaciones preferentes de adyuvante incluyen combinaciones de adyuvantes Th1 y Th2 tales como CpG y aluminio o resiquimod & aluminio. Puede usarse una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL.

Más componentes antigénicos

Las composiciones de la invención incluyen secuencias PUfH modificadas. Es útil si la composición no incluye mezclas complejas o no definidas de antígenos, por ejemplo, es preferente no incluir vesículas de membrana externa en la composición. Los polipéptidos de la invención se expresan preferentemente de manera combinante en un huésped heterólogo y después se purifican.

Así como incluir una secuencia PUfH, una composición de la invención puede también incluir uno o más antígenos adicionales de *Neisseria*, ya que una vacuna que se dirige a más de un antígeno por bacteria reduce la posibilidad de seleccionar mutantes de escape. Así, una composición puede incluir un segundo polipéptido que, cuando se administra a un mamífero, provoca una respuesta de anticuerpo que es bactericida contra meningococo. El segundo polipéptido no será un PUfH meningocócica, pero puede ser, por ejemplo, una secuencia 287, una secuencia NadA, una secuencia 953, una secuencia 936, etc.

Los antígenos para su inclusión en las composiciones incluyen polipéptidos que comprenden uno o más de:

- (a) las 336 SEQ IDs pares (esto es, 2, 4, 6..., 890, 892) desveladas en la referencia 97.
- (b) las 45 SEQ IDs pares (esto es, 2, 4, 6..., 88, 90) desveladas en la referencia 98;
- (c) las 1674 SEQ IDs pares 2-3020, SEQ IDs pares 3040-3114, y todas las SEQ IDs 3115-3241, desveladas en la referencia 3;
- (d) las 2160 secuencias de aminoácido NMB0001 a NMB2160 de la referencia 2;
- (e) una proteínas PorA meningocócica, de cualquier subtipo, preferentemente expresada de manera recombinante;
- (f) una variante, homólogo, ortólogo, parólogo, mutante, etc. de (a) a (e); o
- (g) una preparación de vesícula de membrana externa a partir de *N. meningitidis* [por ejemplo, véase ref. 160].

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

- Un antígeno sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/u Y, tal como el sacárido desvelado en la ref. 99 de serogrupo C [véase también ref. 100] o en ref. 101.
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 102, 103, 104].
- un antígeno de virus de hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, 105, 106].
- un antígeno de virus de hepatitis B, tales como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo, 106, 107].
- un antígeno de difteria, tal como un toxoide de difteria [por ejemplo, capítulo 3 de ref. 108], por ejemplo, el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo, 109].
- un antígeno de tétano, tal como un toxoide de tétano [por ejemplo, capítulo 4 de ref. 108].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como una holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 110 & 111].
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 100].
- antígenos de polio [por ejemplo, 112, 113] tal como IPV.
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubeola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de ref. 108].
- antígenos de gripe [por ejemplo, capítulo 19 de ref. 108], tal como las proteínas de superficie de hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 114].
- un antígeno de proteínas de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo serogrupo B) [por ejemplo, 115, 116].
- un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo serogrupo B).
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo grupo A) [por ejemplo, 116, 117, 118].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo 119].

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

Los antígenos tóxicos de proteínas pueden desintoxicarse donde sea necesario (por ejemplo, desintoxicación de toxina pertussis mediante medios químicos y/o genéticos [111]).

Donde se incluye un antígeno de difteria en la composición es también preferente incluir antígeno de tétano y antígenos de pertussis. Similarmente, donde se incluye un antígeno de tétano es también preferente incluir antígenos de difteria y pertussis. Similarmente, donde se incluye un antígeno de pertussis es también preferente incluir antígenos de difteria y tétano. Así, las combinaciones DTP son preferentes.

Los antígenos de sacárido están preferentemente en forma de conjugados. Las proteínas transportadoras para los conjugados se analizan con más detalle más abajo.

Los antígenos en la composición estarán presentes típicamente en una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de un antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmune contra ese antígeno.

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

Como una alternativa a usar antígenos de proteínas en las composiciones inmunogénicas de la invención, puede usarse ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de plásmido) que codifica el antígeno.

En algunas realizaciones una composición de la invención comprende, además de la secuencia PUfH, antígenos de sacárido capsulares conjugados de 1, 2, 3 o 4 de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y. En otras realizaciones una composición de la invención comprende, además de la secuencia PUfH, al menos un antígeno de sacárido capsular conjugado neumocócico.

Serogrupos meningocócicos Y, W135, C y A

Las vacunas actuales de serogrupo C (Menjugate™ [120, 99], Meningitec™ y NeisVac-C™) incluyen sacáridos conjugados. Menjugate™ y Meningitec™ tienen antígenos de polisacárido conjugados con un transportador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac-C™ usa el polisacárido completo (de-O-acilado) conjugado con un transportador de toxoide de tétano. La vacuna Menactra™ contiene antígenos de sacárido capsular conjugado de cada uno de los serogrupos Y, W135 y A.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir antígenos de sacárido capsular de uno o más serogrupos meningocócicos Y, W135, C y A, donde los antígenos se conjugan con proteínas transportadoras y/o son oligosacáridos. Por ejemplo, la composición puede incluir un antígeno de sacárido capsular de: serogrupo C; serogrupos A y C; serogrupos A, C y W135; serogrupos A, C e Y; serogrupos C, W135 e Y; o de los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y.

Una cantidad típica de cada antígeno sacárido meningocócico por dosis es entre 1µg y 20 µg, por ejemplo, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg (expresado como sacárido).

Donde una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, la proporción (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC puede ser mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Donde una mezcla comprende sacáridos capsulares de serogrupo Y y uno o ambos serogrupos C y W135, la proporción (p/p) de sacárido MenY:sacárido MenW135 puede ser mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor) y/o la proporción (p/p) de sacárido MenY:sacárido MenC puede ser inferior a 1 (por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o menor). Las proporciones preferentes (p/p) para sacáridos de serogrupos A:C:W135:Y son 1:1:1:1, 1:1:1:2, 2:1:1:1, 4:2:1:1, 8:4:2:1, 4:2:1:2, 8:4:1:2, 4:2:2:1, 2:2:1:1, 4:4:2:1, 2:2:1:2, 4:4:1:2 y 2:2:2:1. Las proporciones preferentes (p/p) para sacáridos de serogrupos C:W135:Y son 1:1:1, 1:1:2, 1:1:1, 2:1:1, 4:2:1, 2:1:2, 4:1:2 y 2:2:1. Es preferente el uso de una masa sustancialmente igual de cada sacárido.

Los sacáridos capsulares pueden usarse en forma de oligosacáridos. Se forman convenientemente mediante la fragmentación de polisacárido capsular purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis), que normalmente estará seguida por purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

La fragmentación de polisacárido se realiza preferentemente para dar un grado medio final de polimerización (GP) en el oligosacárido inferior a 30 (por ejemplo, entre 10 y 20, preferentemente alrededor de 10 para serogrupo A; entre 15 y 25 para serogrupos W135 e Y, preferentemente alrededor de 15-20; entre 12 y 22 para serogrupo C, etc.). GP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [121].

Si se realiza hidrólisis, el hidrolizado tendrá el tamaño adecuado para eliminar oligosacáridos de longitud corta [100]. Esto puede conseguirse de varias maneras, tal como ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a o igual a 6 se eliminan preferentemente del serogrupo A, y aquellos inferiores a aproximadamente 4 se eliminan preferentemente de los serogrupos W135 e Y.

Los antígenos de sacárido MenC preferentes se desvelan en la referencia 120, como los usados en Menjugate™.

El antígeno de sacárido puede modificarse químicamente. Esto es particularmente útil para reducir hidrólisis para serogrupo A [122; veas más abajo]. Puede realizarse de-O-acetilación de sacáridos meningocócicos. Para oligosacáridos, la modificación puede tener lugar antes o después de despolimerización.

Donde una composición de la invención incluye un antígeno de sacárido MenA, el antígeno es preferentemente un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo en el sacárido nativo se ha(n) sustituido por un grupo bloqueador [122]. Esta modificación mejora la resistencia a hidrólisis.

Conjugación covalente

Los sacáridos capsulares en las composiciones de la invención estarán normalmente conjugados con proteínas transportadoras. En general, la conjugación mejora la inmunogenicidad de sacáridos ya que los convierte de antígenos T-independientes a antígenos T-dependientes, permitiendo así la preparación para memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida.

Las proteínas transportadoras típicas son toxinas bacterianas, tales como toxinas de difteria y tétano, o toxoides o mutantes de las mismas. El mutante CRM₁₉₇ de toxina de difteria [123] es útil, y es el transportador del producto PREVNAR™. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen complejos de proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [124], péptidos sintéticos [125, 126], proteínas de choque térmico [127, 128], proteínas de pertussis [129, 130], citoquinas [131], linfoquinas [131], hormonas [131], factores del crecimiento [131], proteínas artificiales que comprenden epítopes celulares CD4⁺ T humanos múltiples de varios antígenos derivados de patógenos [132] tales como N19 [133], proteína D de *H. influenzae* [134-136], pneumolisina [137] o sus derivados no tóxicos [138], proteína PspA de superficie meningocócica [139], proteínas de adsorción de hierro [140], toxina A o B de *C. difficile* [141], exoproteína A recombinante de *P. aeruginosa* (rEPA) [142], etc.

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado donde sea necesario.

El sacárido típicamente se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo, 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [143, 144, etc.]. Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidracidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitroenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU, etc.

Las uniones por medio de un grupo conector pueden hacerse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 145 y 146. Otro tipo de unión implica la aminación reductora del polisacárido, acoplando el grupo amino resultante a un extremo de un grupo conector de ácido adípico, y después acoplado una proteína al otro extremo del grupo conector de ácido adípico [147, 148]. Otros conectores incluyen B-propionamido [149], nitrofenil-etilamina [150], haluros de hiloacilo [151], uniones glicosídicas [152], ácido 6-aminocaproico [153], ADH [154], porciones C₄ a C₁₂ [155] etc. Como una alternativa a usar un conector, puede usarse una unión directa. Las uniones directas a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido seguida de animación reductora con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 156 y 157.

Un proceso que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, sustituyendo grupos terminales =O por -NH₂) seguido de derivación con un diéster adípico (por ejemplo, ácido adípico diéster N-hidroxisuccinimido) y reacción con proteína transportada es preferente. Otra reacción preferente usa activación CDAP con proteína transportadora D, por ejemplo, de MenA o MenC.

Vesículas de membrana externa

Es preferente que las composiciones de la invención no incluyan mezclas complejas o no definidas de antígenos, que son características típicas de VME. Sin embargo, la invención puede usarse junto con VME, ya que se ha descubierto que PUfH mejora su eficacia [6], en particular al sobre-expresar los polipéptidos de la invención en las cepas usadas para preparación de VME.

Esta técnica puede usarse en general para mejorar preparaciones de vesículas de *N. meningitidis* serogrupos B [158], "VME nativas" [159], ampollas o vesículas de membrana externa [por ejemplo, refs. 160 a 165, etc.]. Éstas pueden prepararse a partir de bacterias que se han manipulado genéticamente [166-169], por ejemplo,

para aumentar la inmunogenicidad (por ejemplo, hiper-expresar inmunógenos), para reducir toxicidad, para inhibir síntesis de polisacárido capsular, para reducir la expresión PorA, etc. Pueden prepararse a partir de cepas de hiper-vaculización [170-173]. Pueden incluirse vesículas de una *Neisseria* no patogénica [174]. VsME pueden prepararse si uso de detergentes [175, 176]. Pueden expresar proteínas de no *Neisseria* en su superficie [177].
 5 Pueden estar sin LPS. Pueden mezclarse con antígenos recombinantes [160, 178]. Pueden usarse vesículas de bacterias con diferentes subtipos de proteína de membrana exterior clase I, por ejemplo, seis subtipos diferentes [179, 180] usando dos poblaciones diferentes de vesículas fabricadas genéticamente mostrando cada una tres subtipos, o nueve subtipos diferentes usando tres poblaciones diferentes de vesículas fabricadas genéticamente mostrando cada una tres subtipos, etc. Los subtipos útiles incluyen: P1.7,16; P1.5,16; P1.7,1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1; P1.18-1,3,6.

Más abajo se dan más detalles.

Expresión de proteínas

15 Las técnicas de expresión bacteriana son conocidas en la técnica. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a polimerasa bacteriana de ARN e iniciar una transcripción corriente abajo (3') de una secuencia codificadora (por ejemplo, un gen estructural) en mRNA. Un promotor tendrá una región de iniciación de transcripción que normalmente se coloca próxima al extremo 50 de la secuencia codificadora. Esta región de
 20 iniciación de transcripción normalmente incluye un sitio de unión de polimerasa de ARN y un sitio de iniciación de transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio llamado un operador, que puede sobreponerse a un sitio de unión de polimerasa ARN adyacente en el comienzo la síntesis de ARN. El operador permite una transcripción regulada negativa (inducible), ya que una proteína represora de gen puede unirse al operador y de este modo inhibir la transcripción de un gen específico. Puede ocurrir expresión constitutiva en
 25 ausencia e elementos reguladores negativos, tales como el operador. Además, la regulación positiva puede conseguirse por una secuencia de unión de proteína activadora de gen, que, si está presente está normalmente próxima (5') a la secuencia de unión de polimerasa. Un ejemplo de proteína activadora de gen es la proteína activadora por catabolito (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Ribaud et al. (1984) Annu. Rev. Genet. 18:173]. La expresión regulada puede por lo tanto ser positiva o negativa,
 30 aumentando o reduciendo de este modo la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de vía metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcar, tales como galactosa, lactosa (*lac*) [Chang et al. (1977) Nature 198:1056], y maltosa. Ejemplos adicionales incluyen
 35 secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (*trp*) [Goeddel et al. (1980) Nuc. Acids Res. 8:4057; Yelverton et al. (1981) Nucl. Acids. Res. 9:731; patente de Estados Unidos 4.738.921; EP-A-0036776 y EP-A-0121775]. El sistema promotor de β -lactamasa (*bla*) [Weissman (1981) "La clonación de interferón y otros errores". En Interferon 3 (ed. I. Gresser)], los sistemas de PL lambda bacteriófago [Shimatake et al. (1981) Nature 292:128] y promotor T5 [patente de Estados Unidos 4.689.406] también proporcionan secuencias promotoras
 40 útiles. Otro promotor de interés es un promotor inducible de arabinosa (pBAD).

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

Además de una secuencia que funciona como promotora, un sitio de unión de ribosoma eficiente también es útil para la expresión de genes exteriores en procariotas. En *E. coli*, el sitio de unión de ribosoma se llama
 60 secuencia Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de iniciación (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud situada 3-11 nucleótidos corriente arriba del codón de iniciación. La secuencia SD está pensada para promotor la unión de mRNA con el ribosoma mediante el emparejamiento de bases entre la secuencia SD y el extremo 3' de *E. coli* 16S rARN [Steitz et al. (1979) "Señales genéticas y secuencias de nucleótidos en ARN mensajero". En Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. R. F. Goldberger)]. Para expresar genes eucarióticos y genes procarióticos con sitio de unión de ribosoma débil [Sambrook et al. (1989) "Expresión de genes clonados en *Escherichia coli*". En Molecular Cloning: A Laboratory Manual.].
 65

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

Normalmente, las secuencias de terminación de transcripción reconocidas por las bacterias son regiones reguladoras localizadas 3' hasta el codón de parada de traslación, y así junto con el promotor flanquean la secuencia codificadora. Estas secuencias dirigen la transcripción de un mRNA que puede trasladarse al polipéptido codificado por el ADN. Las secuencias de terminación de transcripción frecuentemente incluyen secuencias de ADN de aproximadamente 50 nucleótidos capaces de formar estructuras de tipo tallo-lazo que ayudan a terminar la transcripción. Ejemplos incluyen secuencias de terminación de transcripción derivadas de genes con promotores fuertes, tales como el gen *trp* en *E. coli* así como otros genes biosintéticos.

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, secuencia de señal (si se desea), secuencia codificadora de interés, y secuencia de terminación de transcripción, se ponen juntos en las construcciones de expresión. Las construcciones de expresión a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento extra-cromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaces de un mantenimiento estable en un huésped, tal como bacterias. El replicón tendrá un sistema de réplica, permitiendo así mantenerse en una célula procariótica para expresión o para clonación y amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido de número alto o bajo de copia. Un plásmido de número alto de copia generalmente tendrá un número de copia que oscile entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200, y normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150. Un huésped que contiene un número alto de copia preferentemente contendrá al menos aproximadamente 10, y más preferentemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Puede seleccionarse un vector con número alto o bajo de copia, dependiendo del efecto del vector y de la proteína externa en el huésped.

Alternativamente, las construcciones de expresión pueden estar integradas en el genoma bacteriano con un vector integrante. Los vectores integrantes normalmente contienen una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite que el vector se integre. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores integrantes construidos con ADN de varias cepas *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (EP-A-0127328). Los vectores integrantes también pueden comprender secuencias de bacteriófagos o transposones.

Normalmente, las construcciones extra-cromosómicas y de expresión integrantes pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de cepas bacterianas que se han transformado. Los marcadores seleccionables pueden expresarse en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que dan bacterias resistentes a fármacos tales como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina) y tetraciclina [Davies et al. (1978) Annu. Ref. Microbiol. 32:469]. Los marcadores seleccionables también pueden incluir genes biosintéticos, tales como aquellos en las vías biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

Alternativamente, algunos de los componentes anteriormente descritos pueden unirse en los vectores de transformación. Los vectores de transformación normalmente comprenden un marcador seleccionable que se mantiene en un replicón o se desarrolla en un vector integrante, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de expresión y transformación, bien replicones extra-cromosómicos o vectores integrantes, se han desarrollado para su transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* [Palva et al. 81982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP-A-0036259 y EP-A-0063953; WO84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake et al. (1981) Nature 292:128; Amann et al. (1985) Gene 40:183; Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 y EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powel et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powel et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655], *Streptomyces lividans* [Patente de Estados Unidos 4.745.056].

Los métodos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos son bien conocidos en la técnica, y normalmente incluyen la transformación de bacterias tratadas con CaCl₂ u otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. ADN también puede introducirse con la especie bacteriana que se transformará. Véase, por ejemplo [Masson et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP-A-0036259 y EP-A-0063953; WO84/04541, *Bacillus*], [Miller et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:949; *Campylobacter*], [Cohen et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978). "Un método mejorado para transformación de *Escherichia coli* con plásmidos derivados de ColE1". En Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H. W. Boyer y S. Nicosia); Mandel et al. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*], [Chassy et al. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler et al. (1988) Anal. Biochem 170:38; *Pseudomonas*]; [Augustin et al. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203; *Staphylococcus*], [Barany et al. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander 81987) "Transformación de *Streptococcus lactis* por electroforación" en. *Streptococcal Genetics* (ed. J. Ferretti y R. Curtiss III); Perry et al. (1981) Infect. Immun.

32:1295; Powell et al. (1988). Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti et al. (1987) Proc. 4th. Ever. Cong. Biotechnology 1:412; Streptococcus].

Células huéspedes

5

La invención proporciona una bacteria que expresa un polipéptido de la invención. La bacteria puede ser un meningococo. La bacteria puede expresar constitutivamente el polipéptido, pero en algunas realizaciones la expresión puede estar bajo el control de un promotor inducible. La bacteria puede hiper-exresar el polipéptido (cf. Ref. 181). La expresión del polipéptido puede no ser variables de fase.

10

La invención también proporciona vesículas de membrana externa preparadas a partir de una bacteria de la invención. También proporciona un proceso para producir vesículas a partir de una bacteria de la invención. Las vesículas preparadas a partir de estas cepas incluyen preferentemente el polipéptido de la invención, que debería estar en una forma inmunoaccesible en las vesículas, esto es, un anticuerpo que pueda unirse a un polipéptido purificado de la invención también debería ser capaz de unirse al polipéptido que está presente en las vesículas.

15

Las vesículas de membrana externa incluyen cualquier vesícula proteoliposómica obtenida mediante alteración de una vacuolización de una membrana externa meningocócica para formar vesículas que incluyen componentes proteicos de la membrana externa. Así, los términos incluyen VsME (algunas veces referidas como "ampollas"), microvesículas (MVs [182] y "VsME nativas" ("VsMEN" [183]).

20

MS y VsMEN son vesículas de membrana que ocurren de manera natural que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y se liberan en el medio de cultivo. La MVs pueden obtenerse cultivando *Neisseria* en medio de caldo de cultivo, separando células enteras de las MVs más pequeñas en el medio de caldo de cultivo (por ejemplo, mediante filtración o centrifugación a baja velocidad del medio sin células (por ejemplo, mediante filtración, mediante precipitación diferencial o agregación de MVs, mediante centrifugación a alta velocidad para formar gránulos de las MVs). Las cepas para su uso en la producción de MVs pueden generalmente seleccionarse en base a la cantidad de MVs producidas en cultivo, por ejemplo, refs. 184 y 185 describen *Neisseria* con alta producción de MV.

25

30

VsME se preparan artificialmente a partir de bacterias, y pueden prepararse usando tratamiento con detergente (por ejemplo, con deoxicolato), o con medios no detergentes (por ejemplo, véase referencia 186). Las técnicas para la formación de VsME incluyen tratamiento de bacterias con un detergente de sal ácida de bilis (por ejemplo, sales de ácido litocólico, ácido quenodeoxicólico, ácido ursodeoxicólico, ácido deoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc., con deoxicolato de sodio [187 y 188] siendo preferentes para tratar *Neisseria*) en un pH suficientemente alto para no precipitar el detergente [189]. Pueden realizarse otras técnicas sustancialmente en ausencia de detergente [186] usando técnicas tales como sonicación, homogenización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, pulverización, prensa francesa, mezcla, etc. los método que usan poco o nada de detergente pueden retener antígenos útiles tales como NspA [186]. Así, un método puede usar una tampón de extracción de VME con aproximadamente 0,5% deoxicolato o menos, por ejemplo, aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,1%, <0,05% o cero.

35

40

Un proceso útil para la preparación de VME se describe en la referencia 190 e implica la ultrafiltración en VsME crudas, en lugar de centrifugación a alta velocidad. El proceso puede implicar la etapa de ultracentrifugación después de que la ultrafiltración haya tenido lugar.

45

Las vesículas para su uso con la invención pueden prepararse a partir de cualquier cepa meningocócica. Las vesículas serán normalmente de la cepa de serogrupo B, pero es posible prepararlas a partir de serogrupos diferentes a B (por ejemplo, la referencia 189 desvela un proceso para serogrupo A), tal como A, C, W135 o Y. La cepa puede ser de cualquier serotipo (por ejemplo, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), cualquier serosubtipo y cualquier inmunotipo (por ejemplo, L1; L2; L3, L3,3,7; L10; etc.). Los meningococos pueden ser de cualquier linaje adecuado, incluyendo linajes hiperinvasivos e hipervirulentos, por ejemplo, cualquiera de los siguientes siete linajes hipervirulentos: subgrupo I; subgrupo II; subgrupo IV-1; complejo ET-5; complejo Et-37; grupo A4; linaje 3.

50

55

Las bacterias de la invención, además de codificar un polipéptido de la invención, pueden tener una o más modificaciones adicionales. Por ejemplo, pueden tener un gen *fur* modificado [191]. La referencia 199 muestra que la expresión nspA debería aumentar con *porA* y *cps* nocaout simultáneos, y estas modificaciones pueden usarse. Más mutantes nocaout de *N. meningitidis* para producción de VME se desvelan en las referencias 199 a 201. La referencia 192 desvela la construcción de vesículas de cepas modificadas para expresar seis subtipos diferentes de PorA. *Neisseria* mutante con niveles bajos de endotoxina, conseguida noqueando enzimas implicadas en biosíntesis de LPS, también puede usarse [193, 194]. Estos u otros mutantes pueden usarse en su totalidad con la invención.

60

Así, una cepa usada con la invención en algunas realizaciones expresan más de un subtipo PorA. Las cepas PorA 6-valentes o 9-valentes se han construido previamente. La cepa puede expresar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de subtipos PorA: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1 y/o P1.18-1,3,6. En otras realizaciones, una cepa puede reducirse para expresión de PorA, por ejemplo, en la que la cantidad de

65

PorA se ha reducido al menos 20%(por ejemplo, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, etc.), o incluso se noquea, en relación con niveles de tipo salvaje (por ejemplo, en relación con cepa H44/76).

5 En algunas realizaciones una cepa puede hiper-exprear (en relación con la cepa correspondiente de tipo salvaje) ciertas proteínas. Por ejemplo, las cepas pueden hiper-expresar NspÁ, proteína 287 [195], PUFH [181], TbpA y/o TbpB [196], dismutasa de Cu,Zn-superóxido [196], HmbR, etc.

10 Un gen que codifica un polipéptido de la invención puede estar integrado en el cromosoma bacteriano o puede estar presente en forma episomal, por ejemplo, dentro de un plásmido.

15 Ventajosamente para la producción de vesículas, un meningococo puede estar genéticamente fabricado para asegurar que la expresión del polipéptido no esté sujeta a la variación de fase. Los métodos para reducir o eliminar la variabilidad de fase de expresión de gen en meningococos se desvelan en la referencia 197. Por ejemplo, un gen puede sustituirse bajo el control de un promotor constitutivo o inducible, o eliminando o sustituyendo el motivo de ADN que es responsable de su variabilidad de fase.

20 En algunas realizaciones una cepa puede incluir una o más mutaciones no-caut y/o de hiper-expresión desveladas en las referencias 198 a 201. Los genes preferentes para la reducción y/o noqueo incluyen: (a), Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LpbA, LpbB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB [198]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LpbA, LpbB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB [199]; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LpbA, LpbB, Opa, Opc, PilC PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB [200]; y (c) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, Opa, OpC, PilC, PorB, SiaD, SynA, Synb y/o SynC [201].

25 Donde se usa un cepa mutante, en algunas realizaciones puede tener una o más, o todas, de las siguientes características: (i) LgtB y/o GalE reducido o noqueado para truncar LOS meningocócicos; (ii) TbpA aumentado; (iii) NhhA aumentado; (iv) Omp85 aumentado; (v) LpbA aumentado; (vi) NspA aumentado; (vii) PorA noqueado; (viii) FrpB reducido o noqueado; (ix) Opa reducido o noqueado; (x) Opc reducido o noqueado; (xii) complejo de gen *cps* eliminado. Un LOS truncado puede ser aquel que no incluya un epitope sialil-lacto-N-neotetraosa, por ejemplo, puede ser un LOS deficiente de galactosa. Los LOS pueden no tener cadena α .

30

Dependiendo de la cepa meningocócica usada para preparar las vesículas, pueden o no incluir el antígeno PUFH nativo de la cepa [202].

35 Si LOS está presente en una vesícula es posible tratar la vesícula para unir sus Los y componentes proteicos (conjugación "intra-ampolla" [201]).

General

40 Los términos "que comprende(n)" incluyen "que incluye(n)" así como "que consiste(n)", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

45 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

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

50 "Identidad secuencial" se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman como los implementa el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de hueco afín con parámetros penalización de abertura de hueco = 12 y penalización de extensión de hueco = 1.

55 Después del serogrupo, la clasificación meningocócica incluye serotipo, serosubtipo y después inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera serogrupo, serotipo, serosubtipo e inmunotipo, cada uno separado por dos puntos, por ejemplo, B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes pueden causar a menudo enfermedades (hipervirulentos), algunos linajes causan formas más severas de enfermedad que otros (hipervirulentos) y otros causan enfermedad rara vez. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, concretamente subgrupos I, III y IV-1, complejo ET-5, complejo ET-37, grupo A4 y linaje 3. Estos se han definido mediante electroforesis de enzimas multilocus (EEML), pero también se ha usado la tipificación de secuencias multilocus (TSML) para clasificar meningococos [ref. 19]. Los cuatro grupos virulentos principales son los complejos ST32, ST44, ST8 y ST11.

60

65 En general, la invención no incluyen las varias secuencias de PUFH específicamente desveladas en las referencias 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 203.

Modos para realizar la invención

Con la secuencia MC58 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) como una referencia, se han preparado 72 secuencias PUFH modificadas. Estas se muestran en el listado secuencial como SEQ ID Nos: 4 a 75.

Los polipéptidos se han expresado en E. coli con una metionina de terminal N seguida inmediatamente por una secuencia de aminoácido SEQ ID NO. El polipéptido se ha combinado con adyuvante completo de Freud, MF59 o adyuvante de hidróxido de aluminio y después se ha usado para inmunizar ratones. Los antisueros de los ratones se han analizado en un ensayo bactericida contra un panel de diez cepas meningocócicas. El panel incluía cepas de cada una de las tres familias PUFH. También se preparó el polipéptido MC58 de tipo salvaje.

Dos de los polipéptidos que se expresaron y purificaron son SEQ ID Nos 79 ("PATCH_9C") Y 80 ("PATCH_10A"), que comprenden SEQ ID Nos: 20 y 23, respectivamente. Todos los polipéptidos analizados obtuvieron sueros que mostraron actividad bacteriana (Título SBA ≥ 128) contra al menos dos cepas en el panel (y normalmente más), pero los polipéptidos 9C y 10A no fueron dignos de tomarse en cuenta porque sus sueros mostraron buena actividad bacteriana en todo el panel, incluyendo contra la cepa M1239. Los títulos con 9C y 10A fueron los siguientes:

Cepa	Familia PUFH	SEQ ID NO: 1		SEQ ID No. 79		SEQ ID NO: 80	
		ACF	AI-H	MF59	AI-H	MF59	AI-H
MC58	1	>32768	32768	16384	>32768	2048	16384
NM008	1	4096	<16	1024	4096	64	128
M4030	1	2048	256	4096	32768	64	1024
GB185	1	2048	32	256	>8192	512	2048
NZ	1	4096	128	256	>8192	16	256
961-5945	2	128	<16	1024	4096	4096	2048
M3153	2	128	<16	1024	2048	4096	4096
C11	2	32	<16	64	512	512	128
M2552	2	<16	<16	4096	2048	>8192	2048
M1239	3	64	<16	<16	512	2048	1024

Así, los anticuerpos anti-PUFH obtenidos mediante secuencia MC58 de tipo salvaje son efectivos contra cepas que expresan una familia 1 PUFH, pero son relativamente inefectivos contra cepas en la familia PUFH 2 ó 3. En cambio, los sueros obtenidos por las dos secuencias modificadas son efectivos contra un panel de cepas que incluyen las tres familias de PUFH. SEQ ID NO: 79 ("PATCH_9C") es particularmente efectiva en este aspecto. En particular, en muchos casos los sueros obtenidos contra este polipéptido fueron al menos efectivos contra las diez cepas como sueros de control provocadas contra la propia PUFH de la cepa (cuando se usa un adyuvante de hidróxido de aluminio). En todos salvo en un caso hubo más de un descenso en la dilución:

Cepa	Familia PUFH	PUFH homóloga	SEQ ID NO: 79
MC58	1	32768	>32768
NM008	1	Sin datos	4096
M4030	1	256	32768
GB185	1	2048	>8192
NZ	1	2048	>8192
961-5945	2	2048	4096
M3153	2	2048	2048
C11	2	1024	512
M2552	2	>8192	2048
M1239	3	1024	512

La actividad del mutante de PATCH_9C se confirmó después de la formulación con Adyuvante Completo de Freund (ACF) o una mezcla de IC31™ con alum:

5

10

15

20

Cepa	Familia PUfH	Adyuvante ACF	IC31+Alum
MC58	1	8192	>32768
NM008	1	1024	1024
M4030	1	8192	2048
GB185	1	8192	4096
NZ	1	2048	4096
961-5945	2	8192	4096
M3153	2	2048	4096
C11	2	2048	1024
M2552	2	2048	4096
M1239	3	512	1024

25

La SEQ ID NO: 77 es una secuencia de PUfH encontrada en una cepa de tipo salvaje ("NL096"). La SEQ ID NO: 78 la codifica. Aunque esta es una secuencia natural no se ajusta bien a las variantes que se han presentado previamente. En su lugar, parece ser una intermediaria entre familias I y II. Los sueros provocados usando una forma ΔG de la secuencia NL096, usando dos adyuvantes diferentes (ACF o hidróxido de aluminio), se analizaron contra un panel de ocho cepas y los títulos bactericidas fueron los siguientes:

30

35

40

45

Cepa	Familia PUfH	ACF	Al+H
NL096	-	8192	1024
MC58	1	>32768	2048
NM008	1	4096	1024
GB185	1	≥16384	2048
NZ98/254	1	1024	256
961-5945	2	>32768	8192
M3153	2	>32768	8192
M1239	3	4096	256

50

Así, el polipéptido NL096 obtiene anticuerpos que muestran un amplio espectro de actividad bacteriana. Para todas las cepas heterólogas excepto NZ98/254 los títulos obtenidos usando ACF fueron al menos tan alto como los títulos obtenidos usando IC31™+alum con el mutante PATCH_9C.

REFERENCIAS

55

[1] Jodar et al. (2002) *Lancet* 359(9316):1499-1508.

[2] Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820.

[3] WO99/57280

[4] Masignani et al. (2003) *J Exp Med* 197:789-799.

[5] Welsch et al. (2004) *J Immunol* 172:5605-15.

60

[6] Hou et al. (2005) *J Infect Dis* 192(4):580-90.

[7] WO03/063766.

[8] Fletcher et al. (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100.

[9] Zhu et al. (2005) *Infect Immun* 73(10):6838-45.

[10] WO01/64920.

65

[11] WO03/020756.

[12] WO2004/048404.

[13] WO2006/024954.

- [14] WO2007/060548.
- [15] Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- [16] Rice et al. (2000) *Trends Genet* 16:276-277.
- 5 [17] Achtman (1995) *Epidemiología global de enfermedad meningocócica*. Páginas 159-175 de *Meningococcal disease* (ed. Cartwright). ISBN: 0-471-95259-1.
- [18] Caugant (1998) *APMIS* 106:505-525.
- [19] Maiden et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140-3145.
- [20] WO01/30390.
- 10 [21] Gennaro (2000) *Remington: La Ciencia y Práctica de Farmacia*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [22] WO03/009869.
- [23] Vaccine Design... (1995) eds. Powel & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [24] WO00/23105.
- [25] WO90/14837.
- [26] WO90/14837.
- 15 [27] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [28] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [29] *Diseño de Vacuna: La Subunidad y Técnica de Adyuvante* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)
- 20 [30] *Adyuvantes de Vacuna: Métodos de Preparación y Protocolos de Búsqueda* (Volumen 2 de la serie *Methods in Molecular Medicine*). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [31] US 5.057.540.
- [32] WO96/33739.
- [33] EP-A-0109942.
- 25 [34] WO96/11711.
- [35] WO00/07621.
- [36] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [37] Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [38] Niikura et al. (2002) *Virology* 293:273-280.
- 30 [39] Lenz et al. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [40] Pinto et al. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [41] Gerber et al. (2001) *J Virol* 75:4752-4760.
- [42] WO03/024480.
- [43] WO03/024481.
- 35 [44] Gluck et al. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [45] EP-A-0689454.
- [46] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [47] Evans et al. (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2:219-229.
- [48] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- 40 [49] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [50] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [51] WO02/26757.
- [52] WO99/62923.
- [53] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- 45 [54] McCluskie et al. (2002). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [55] WO98/40100.
- [56] US 6.207.646.
- [57] US 6.239.113.
- [58] US 6.429.199.
- 50 [59] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658.
- [60] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [61] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [62] WO01/95935.
- [63] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- 55 [64] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [65] WO03/035836.
- [66] Schellack et al. (2006) *Vaccine* 24:5461-72.
- [67] WO95/17211.
- [68] WO98/42375.
- 60 [69] Beignon et al. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [70] Piazza et al. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [71] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [72] Scharton-Kersten et al. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [73] Ryan et al. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [74] Partidos et al. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- 65 [75] Peppoloni et al. (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2:285-293.
- [76] Pine et al. (2002) *J Control Release* 85:263-270.

- [77] Tebbey et al. (2000) *Vaccine* 18:2723-34.
 [78] Domenighini et al. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
 [79] WO99/40936.
 [80] WO99/44636
 5 [81] Singh et al. (2001) *J Cont Release* 70:267-276
 [82] WO99/27960.
 [83] US 6.090.406.
 [84] US 5.916.588.
 [85] EP-A-0626169.
 10 [86] WO99/52549.
 [87] WO01/21207.
 [88] WO01/21152.
 [89] Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 [90] Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Reviews* 31:185-196.
 15 [91] Stanley et al. (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
 [92] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
 [93] WO99/11241.
 [94] WO94/00153.
 [95] WO98/57659.
 20 [96] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
 [97] WO99/24578.
 [98] WO99/36544.
 [99] Constantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
 25 [100] Constantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
 [101] WO03/007985.
 [102] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 [103] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285,v.
 [104] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
 [105] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
 30 [106] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
 [107] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Supl:S63-68 y 79-80.
 [108] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 [109] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
 [110] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 35 [111] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 [112] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 [113] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
 [114] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S101-107.
 [115] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
 40 [116] WO02/34771.
 [117] Dale (1999) *Infect. Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 [118] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 [119] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264): 1225-1240; véase también páginas 1218-1219.
 [120] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
 45 [121] Ravenscroft et al. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
 [122] WO03/080678.
 [123] *Resarch Disclosure*, 453077 (Enero 2002)
 [124] EP-A-0372501.
 [125] EP-A-0378881.
 50 [126] EP-A-0427347.
 [127] WO93/17712.
 [128] WO94/03208.
 [129] WO98/58668.
 [130] EP-A-0471177.
 55 [131] WO91/01146.
 [132] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
 [133] Baraldo et al. (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
 [134] EP-A-0594610.
 [135] Ruan et al. (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
 60 [136] WO00/56360.
 [137] Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13
 [138] Michon et al. (1998) *Vaccine* 16:1732-41.
 [139] WO02/091998.
 [140] WO01/72337.
 65 [141] WO00/61761.
 [142] WO00/33882.

- 5
 [143] Lees et al. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
 [144] WO95/083348.
 [145] Patente de Estados Unidos 4.882.317.
 [146] Patente de Estados Unidos 4.695.624.
 [147] Porro et al. (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s.
 [148] EP-A-0208375.
 [149] WO00/10599.
 [150] Gever et al. *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979).
 10 [151] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
 [152] Patentes de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
 [153] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
 [154] Patente de Estados Unidos 4.965.338.
 [155] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
 15 [156] Patente de Estados Unidos 4.761.283.
 [157] Patente de Estados Unidos 4.356.170.
 [158] WO02/09643.
 [159] Katia et al. (2002) *Infect Immun* 70:702-707.
 [160] WO01/52885.
 20 [161] Patente europea 0301992.
 [162] Bjune et al. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
 [163] Fukasawa et al. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
 [164] WO02/09746.
 [165] Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
 25 [166] WO02/09350.
 [167] Patente europea 0449958.
 [168] EP-A-0996712.
 [169] EP-A-0680512.
 [170] WO02/062378.
 30 [171] WO99/59625.
 [172] Patente de Estados Unidos 6.180.111.
 [173] WO01/34642.
 [174] WO03/051379.
 [175] Patente de Estados Unidos 6.558.677.
 35 [176] WO2004/019977.
 [177] WO02/062380.
 [178] WO00/25811.
 [179] Peeters et al. (1996) *Vaccine* 14:1008-1015.
 [180] Vermont et al. (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.
 40 [181] WO2006/081259.
 [182] WO02/09643.
 [183] Katial et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
 [184] Patente de Estados Unidos 6.180.111.
 [185] WO01/34642.
 45 [186] WO2004/019977.
 [187] Patente europea 011243.
 [188] Fredriksen et al. (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
 [189] WO01/91788.
 [190] WO2005/004908.
 50 [191] WO98/56901.
 [192] Claasen et al. (1996) 14(10):1001-8.
 [193] WO99/10497.
 [194] Steeghs et al. (2001) *The EMBDO Journal* 20:6937-6945.
 [195] WO01/52885.
 55 [196] WO00/25811.
 [197] WO2004/015099.
 [198] WO01/09350.
 [199] WO02/09746.
 [200] WO02/062378.
 60 [201] WO2004/014417.
 [202] WO2004/046177.
 [203] WO2004/094596.

NOMBRES ALTERNATIVOS PARA SECUENCIAS EN EL LISTADO SECUENCIAL

	SEQ ID NO:	Descripción	SEQ ID NO:	Descripción
5	1	PUfH, cepa MC58- familia I	42	PATCH_12B
	2	PUfH, cepa 961-5945 y 2996- familia II	43	PATCH_12C
	3	PUfH, cepa MC58- familia I	44	PATCH_12D
10	4	LOOP2	45	PATCH_12E
	5	PATCH_1	46	PATCH_12F
	6	PATCH_2	47	PATCH_12G
	7	PATCH_2S	48	PATCH_12H
15	8	PATCH_2T	49	PATCH_12I
	9	PATCH_2FAT	50	PATCH_12L
	10	PATCH_3	51	PATCH_12M
20	11	PATCH_5	52	PATCH_12N
	12	PATCH_5bis	53	PATCH_13
	13	PATCH_5tris	54	PATCH_13B
	14	PATCH_5tetra	55	PATCH_13C
25	15	PATCH_5penta	56	PATCH_14
	16	PATCH_8	57	PATCH_14B
	17	PATCH_8B	58	PATCH_14C
30	18	PATCH_9	59	PATCH_14D
	19	PATCH_9B	60	PATCH_15A
	20	PATCH_9C	61	PATCH_15B
35	21	PATCH_9D	62	PATCH_16A
	22	PATCH_9E	63	PATCH_16B
	23	PATCH_10A	64	PATCH_16C
	24	PATCH_10B	65	PATCH_16D
40	25	PATCH_10C	66	PATCH_16E
	26	PATCH_10D	67	PATCH_16F
	27	PATCH_10E	68	PATCH_16G
45	28	PATCH_10F	69	PATCH_17A
	29	PATCH_10G	70	PATCH_17B
	30	PATCH_10H	71	PATCH_17C
50	31	PATCH_11	72	PATCH_18A
	32	PATCH_11B	73	PATCH_18B
	33	PATCH_11C	74	PATCH_18C
	34	PATCH_11D	75	PATCH_18D
55	35	PATCH_11E	76	NL096
	36	PATCH_11F	77 y 78	NL096_FULL
	37	PATCH_11G	79	Met-PATCH_9C
60	38	PATCH_11H	80	Met-PATCH_10A
	39	PATCH_11I	81	IC31
	40	PATCH_11L	82	IC31
65	41	PATCH_12	83	AA 27-274 de SEQ 1

LISTADO SECUENCIAL

SEQ ID NO: 1 – cepa MC58 – familia I

5 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGD
SLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSF
DKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGS
YSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 2 – cepas 961-5945 y 2996– familia II

10 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGD
SLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSF
15 NQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
HLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 3 – cepa M1239– familia III

20 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQAQAEK
FKAGDKDNSLNTGKLNKDKVSRFDQVQKIEVDGQTITLASGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSF
LGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKLEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRY
GSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 4

25 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQINNPDKIDSMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDQLPDGKRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
30 HIGLAAKQLE

SEQ ID NO: 5

35 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDQLPDGKRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 6

40 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNRIEHLKSPELNVELAAADIKPDGKRHAVISGDVRYGGEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIRNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 7

45 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNRIEHLKSPELNVELASADIKPDGKRHAVISGDVRYGGEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIRNGIR
HIGLAAKQLE

SEQ ID NO: 8

50 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNRIEHLKSPELNVELATADIKPDGKRHAVISGDVRYGGEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIRNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 9

55 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNRIEHLKSPELNVELASADIKPDGKRHAVISGDVRYGGEKGTYSYSLGIFGGKAQEVAGSATVKIRNGIH
EIGLAAKQ

SEQ ID NO: 10

60 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQINNPDKIDSMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDQLPDGKRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNRIEHLKSPELNVELASADIKPDGKRHAVISGDVRYGGEKGTYSYSLGIFGGKAQEVAGSATVKIRNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 11

65 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHIDKMAKRQFRISGIAGEHTSFDKLPPEGKAEYHGKAFGSDDPNGLRHL

5 YSIDFAAKQGNRIEHLKSPENVELASADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 12

10 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHTDKMVAKRQFRISGIAGEHTSFDKLEGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
YTIDFAAKQGNRIEHLKSPENVELASADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 13

15 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHTDKMVAKRQFRISGIAGEHTSFDKLEGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
YTIDFAAKQGYGRIEHLKSPENVELASADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 14

20 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHTDKMVAKRQFRISGIAGEHTSFDKLEGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
YSIDFAAKQGYGRIEHLKSPENVELASADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 15

25 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHTDKMVAKRQFRISGIAGEHTSFDKLEGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
YTIDFAAKQGHGRIEHLKSPENVELAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 16

30 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGKATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPENVDLASAEIKADEKSHAVILGDVRYNQAEEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 17

35 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGKATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPENVDLAAAEIKADEKSHAVILGDVRYNQAEEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 18

40 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGKATYHGKAFGSDDPNGRLH
YSIDFAAKQGYGRIEHLKTPQNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIREGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 19

45 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGKATYHGKAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGHGRIEHLKTPQNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIREGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 20

50 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGKATYHGKAFGSDDPNGRLH
YTIDFAAKQGYGRIEHLKTPQNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIREGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 21

55 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGKATYHGKAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGHGRIEHLKTPQNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIREGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 22

60 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGKATYHGKAFGSDDPNGRLH
65

YTIDFAAKQGYGRIEHLKTPEQNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAEVAGSAEVKIREGIR
HIGLAAKQ

5

SEQ ID NO: 23

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPDGKAEYRGTAFGSDDAGGKLT
TIDFTKKQNGKIEHLKSPELNVELASAEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

10

SEQ ID NO: 24

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPSGKAEYRGTAFGSDDAGGKLT
TIDFTKKQNGKIEHLKSPELNVELASAEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

15

SEQ ID NO: 25

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPSGKAEYRGTAFGSDDAGGKLT
TIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVELASAEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

20

SEQ ID NO: 26

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPDGKAEYRGTAFGSDDAGGKLT
TIDFTKKQNGKIEHLKSPELNVELAAAIEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

25

SEQ ID NO: 27

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPDGKAEYRGTAFGSDDAGGKLT
TIDFTKKQNGKIEHLKSPELNVELASAEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

30

SEQ ID NO: 28

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPDGKAEYRGTAFGSDDAGGKLT
TIDFTNKQNGKIEHLKSPELNVELASAEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

35

SEQ ID NO: 29

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPGGKAEYRGTAFGSDDAGGKLT
TIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVELAAAIEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

40

SEQ ID NO: 30

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPGGKAEYRGTAFGSDDAGGKLT
TIDFTKKQNGKIEHLKSPELNVELASAEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

45

SEQ ID NO: 31

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQNGKIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVLYGSEEKGTYHLGIFGGKAEVAGSATVKIGEKVH
HIGLAAKQ

50

SEQ ID NO: 32

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQNGKIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVLYGSEEKGTYHLGIFGGKAEVAGSATVKIGEKVH
HIGLAAKQ

55

SEQ ID NO: 33

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT

60

65

5 YTIDFAAKQGNKGIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVRYGGEEKGYHLGIFGGKAQEVAGSATVKIREKVH
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 34

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
10 YTIDFAAKQGNKGIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVRYGGEEKGYHLGIFGGKAQEVAGSATVKIREKVH
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 35

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
15 YTIDFAAKQGNKGIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVRYGSEEKGYHLGIFGGKAQEVAGSATVKIREKVH
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 36

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPDKSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
20 YTIDFAAKQGNKGIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVRYGSEEKGYHLGIFGGKAQEVAGSATVKIGEKVH
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 37

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPDKSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
25 YTIDFAAKQGNKGIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVRYGGEEKGYHLGIFGGKAQEVAGSATVKIGEKVH
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 38

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPDKSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
30 YTIDFAAKQGNKGIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVRYGGEEKGYHLGIFGGKAQEVAGSATVKIREKVH
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 39

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPDKSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
35 YTIDFAAKQGNKGIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVRYGGEEKGYHLGIFGGKAQEVAGSATVKIREKVH
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 40

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPDKSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
40 YTIDFAAKQGNKGIEHLKTPELNVDLAAADIKADEKRHAVILGDVRYGSEEKGYHLGIFGGKAQEVAGSATVKIREKVH
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 41

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
45 SIDFTKKQGNKGIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 42

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPDKIDSMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
50 SIDFTKKQGNKGIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 43

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
55 SIDFTKKQGNKGIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 44

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPDKIDSMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
60

65

5 SIDFTKKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 45

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
10 TIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 46

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQINNPDKIDSMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
15 TIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 47

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
20 SIDFTKKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 48

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQINNPDKIDSMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
25 SIDFTKKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 49

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
30 TIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 50

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQINNPDKIDSMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
35 TIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 51

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQINNPDKIDSMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
40 SIDFTNKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 52

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGTAFGSDDAGGKLT
45 SIDFTNKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAAEIKADEKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRH
IGLAAKQ

SEQ ID NO: 53

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLH
50 YSIDFTKKQGYGRIEHLKTPELNVELASADIKPDGKRHAVISGSVRYNGSEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTGEGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 54

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLH
55 YSIDFAAKQGHGRIEHLKTPELNVELASADIKPDGKRHAVISGSVRYNGSEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTGEGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 55

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLH
60

65

YSIDFAAKQGHGRIEHLKTPELNVELASADIKPDGKRHAVISGSVRYNGGEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTRREGIR
HIGLAAKQ

5

SEQ ID NO: 56

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKVRQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAAELKADEKRHAVILGDVLYNQEEKGTYSGLIFGGKAQEVAGSATVKTVNGIH
EIGLAAKQ

10

SEQ ID NO: 57

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPKIDSMVAKRQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAAELKADEKRHAVILGDVLYNQEEKGTYSGLIFGGKAQEVAGSATVKTVNGIH
EIGLAAKQLE

15

SEQ ID NO: 58

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKVRQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAAELKADEKSHAVILGDVLYNQEEKGTYSGLIFGGKAQEVAGSATVKTVNGIH
EIGLAAKQ

20

SEQ ID NO: 59

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQINNPKIDSMVAKRQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAAELKADEKSHAVILGDVLYNQEEKGTYSGLIFGGKAQEVAGSATVKTVNGIH
EIGLAAKQ

25

SEQ ID NO: 60

VAADIGAGLADALTTPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
TITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDPNGRLT
YSIDFTAKQGNRIEHLKTPEQNVDLASAELKPDGKRHAVISGSVRYNGGEEKGTYSGLIFGGKAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

30

SEQ ID NO: 61

VAADIGAGLADALTTPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
TITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDPNGRLT
YSIDFTAKQGHGRIEHLKTPEQNVELASAYLKPDEKHHAVISGSVRYNGGEEKGTYSGLIFGGKAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

35

SEQ ID NO: 62

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKVRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVELAAAADIKADGKRHAVILGDTRYGSEEKGTYSGLIFGGKAQEVAGSAEVKTRNGIR
HIGLAAKQ

40

SEQ ID NO: 63

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKVRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVELAAAADIKADGKRHAVILGDTRYGSEEKGTYSGLIFGGKAQEVAGSAEVKTRNGIR
HIGLAAKQ

45

SEQ ID NO: 64

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKVRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNRIEHLKSPELNVELAAAADIKADGKRHAVILGDTRYGSEEKGTYSGLIFGGKAQEVAGSAEVKTRNGIR
HIGLAAKQ

50

SEQ ID NO: 65

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKVRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNRIEHLKSPELNVELAAAADIKADGKRHAVILGDTRYGSEEKGTYSGLIFGGKAQEVAGSAEVKTRNGIR
HIGLAAKQ

55

SEQ ID NO: 66

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKVRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFIGSDDAGGKLT
H

60

65

5 YTIDFAKKQGNRIEHLKSPENVELAAADIKADGKRHAVILGDTRYGGEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 67

10 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAKKQGNRIEHLKSPENVELAAADIKADGKRHAVILGDTRYGSEEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 68

15 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPENVELAAADIKADGKRHAVILGDTRYGSEEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTRNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 69

20 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYHGKAFGSDDPNRGLH
YTIDFAAKQGYGRIEHLKTPQNVELASAEIKPDGKRHAVILGDVRYGSEEKGTYHLGI FGGKAQEVAGSAEVKIGEGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 70

25 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYHGKAFGSDDPNRGLH
YTIDFAAKQGYGRIEHLKTPQNVELASAEIKPDGKRHAVILGDVRYGSEEKGTYHLGI FGGKAQEVAGSAEVKIGEGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 71

30 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYHGKAFGSDDPNRGLH
YTIDFAAKQGYGRIEHLKTPQNVELASAEIKPDGKRHAVILGDVRYGSEEKGTYHLGI FGGKAQEVAGSAEVKIGEGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 72

35 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGYGRIEHLKSPENVELASAEIKADEKSHAVILGDVRYGSEEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 73

40 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGYGRIEHLKSPENVELASAEIKADEKSHAVILGDVRYGSEEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 74

45 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVELASAEIKADEKSHAVILGDVRYGSEEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 75

50 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDLGGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVELASAEIKADEKSHAVILGDVRYGSEEKGTYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 76

55 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGK
LITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMAKQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVELATAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

SEQ ID NO: 77

60 MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGD
SLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGKLTITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMAKQFRIGDIAGEHTSF

65

5 DKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 78

GTGAACCGAACTGCCTTCTGCTGCTTTTCTCTGACCGCCGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGGGCGGTGT
CGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGCAGTCTTTAA
10 CGCTGGATCAGTCCGTGAGGAAAAACGAGAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAAAACTTATGGAAACGGCGAC
AGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGAAGCT
CATTACCTTGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTCAGACCGAGCAAGTAC
AAGACTCGGAGGATCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGGCAGATAGCGGGCGAACATACATCTTTT
15 GACAAGCTTCCCAAAGCGGCAGTGCACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCTGGCGGAAAACTGACCTA
TACTATAGATTTCCGCCCAAGCAGGGACACGGCAAATCGAACATTTGAAATCGCCCGAACTCAATGTCGAGCTTGCCA
CCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGGCAC
TACCACCTGCCCTTTTCGGCGACCGGCCCAAGAAATCGCCGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAAGGTTACGA
AATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAA

SEQ ID NO: 79

20 MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDG
QLITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYHGKAFGSDDPNGRL
HYTIDFAAKQGYGRIEHLKTPQNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIGEGI
RHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 80

25 MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDG
QLITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPDGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
YTIDFTKKQNGKIEHLKSPELNVELASAEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

SEQ ID NO: 81

30 ICICICICICICICICICICICIC

SEQ ID NO: 82

KLKLLLLLKLK

SEQ ID NO: 83

35 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQ
LITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 23
- 5 2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende la SEQ ID NO: 80.
3. Ácido nucleico que codifica el polipéptido de cualquier reivindicación precedente.
- 10 4. Un plásmido que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
5. Una célula huésped transformada con el plásmido de la reivindicación 4.
- 15 6. La célula huésped de la reivindicación 5, donde la célula es una bacteria meningocócica.
7. Vesículas de membrana preparadas a partir de la célula huésped de la reivindicación 6, donde las vesículas incluyen un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 20 8. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o una vesícula de la reivindicación 7.
9. La composición de la reivindicación 8, que incluye un adyuvante.
- 25 10. La composición de la reivindicación 9, donde el adyuvante comprende una sal de aluminio.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que además comprende un segundo polipéptido que, cuando se administra a un mamífero, obtiene una respuesta de anticuerpo que es bactericida contra meningococo, siempre y cuando el segundo polipéptido no sea una PufH meningocócica.
- 30 12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que además comprende un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y.
- 35 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que además comprende un sacárido capsular conjugado neumocócico.
- 40 14. El polipéptido de la reivindicación 1 o reivindicación 2, o las vesículas de la reivindicación 7, para su uso como un medicamento, por ejemplo para prevenir infección meningocócica en un mamífero.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65