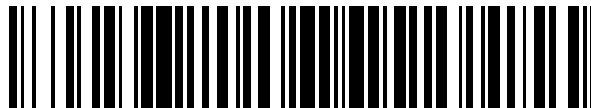


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 770**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2002 E 10179788 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2360176**

54 Título: **Expresión híbrida y en tándem de proteínas procedentes de Neisseria**

30 Prioridad:

06.09.2001 GB 0121591

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

20.01.2016

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

PIZZA, MARIAGRAZIA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 556 770 T3

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

DESCRIPCIÓN

Expresión híbrida y en tándem de proteínas procedentes de *Neisseria*

Campo técnico

5 Esta invención está en el campo de la expresión de proteínas. En particular, se refiere a la expresión de proteínas de *Neisseria* (p. ej., *N. gonorrhoeae* o, preferentemente, *N. meningitidis*).

Antecedentes de la invención

10 Las referencias 1 y 2 revelan planteamientos alternativos y mejorados para la expresión de las proteínas de *Neisseria* desveladas en las referencias 3 a 6. Uno de dichos métodos es producir proteínas "híbridas" en las que dos o más proteínas de *Neisseria* se expresan como una única cadena polipeptídica. Este planteamiento ofrece dos ventajas. Primero, se puede ayudar a una proteína que podría ser inestable o expresarse débilmente por sí misma mediante la adición de un colaborador híbrido adecuado que solucione el problema. Segundo, la fabricación comercial se simplifica, ya que sólo es necesario emplear una expresión y purificación para producir por separado dos proteínas útiles.

15 Es un objeto de la presente invención proporcionar más planteamientos alternativos y mejorados para la expresión de proteínas de *Neisseria*.

Divulgación de la invención**Mezclas**

La invención proporciona una composición que comprende las siguientes proteínas:

- 20 (1) 961
 (2) $\text{NH}_2\text{-A-[-X-L-]}_n\text{-B-COOH}$, en la que $n=2$, $X_1=287, X_2=953$
 (3) $\text{NH}_2\text{-A-[-X-L-]}_n\text{-B-COOH}$, en la que $n=2$, $X_1=936, X_2=741$

Las proteínas 287 y 741 están incluidas en la mezcla y pueden estar en la forma "ΔG". La proteína 961 está incluida y está preferentemente en la forma "961c", en la cual están ausentes el extremo N-terminal líder y el anclaje de membrana C-terminal anclado la membrana (véanse, p. ej., las referencias 1, 2 y 10).

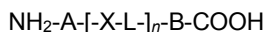
25 Una mezcla preferida comprende las siguientes tres proteínas:

- (1) 961c, preferentemente 961_{C2996} (p. ej., SEC ID 31 en el presente documento);
 (2) $\text{NH}_2\text{-A-[-X-L-]}_n\text{-B-COOH}$, en la que n es 2, $-X_1-$ es ΔG287 (preferentemente ΔG287_{NZ}), $-X_2-$ es 953 (preferentemente 953₂₉₉₆) carente de su péptido líder, $-L1-$ es GSGGGG, y $-A-$ comprende una metionina N-terminal (p. ej., $-A-$ es M o MA) (p. ej., SEC ID 28 y 29 en el presente documento); y
 30 (3) $\text{NH}_2\text{-A-[-X-L-]}_n\text{-B-COOH}$, en la que $n=2$, $X_1=936$ (preferentemente 936₂₉₉₆), $X_2=\Delta\text{G741}$ (preferentemente ΔG741_{MC58}), $L1=\text{GS-GGGG}$ (p. ej., SEC ID 30 en el presente documento).

Las mezclas también comprenden vesículas de la membrana externa de *N. meningitidis*.

Proteínas híbridas

35 Las proteínas híbridas se unen de forma que se traduzcan como una única cadena polipeptídica y pueden representarse mediante la fórmula:



en la que X es una secuencia de aminoácidos, L es una secuencia engarzadora de aminoácidos opcional, A es una secuencia de aminoácidos opcional N-terminal, B es una secuencia de aminoácidos opcional C-terminal y n es un número entero mayor que 1.

40 El valor de n es 2.

Las porciones-X-

Las proteínas híbridas comprenden una primera porción-X- ($-X_a-$) y una segunda porción-X- ($-X_b-$). La porción $-X_b-$ se refiere a $-X_n-$ tal que: (i) $-X_b-$ tiene identidad de secuencia con $-X_a-$, y/o (j) $-X_b-$ comprende un fragmento de $-X_a-$. Las porciones $-X_a-$ y $-X_b-$ pueden estar en cualquier orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal.

45 El grado de "identidad de secuencia" referido anteriormente es mayor que 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más, hasta 100 %. Esto incluye mutantes, homólogos, ortólogos, variantes alélicas, etc., (p. ej., véase la ref. 7). La identidad se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman, ejecutado en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda de huecos afines, con parámetros de penalización

por apertura de hueco=12 y penalización por extensión de hueco=1. Típicamente, una identidad del 50 % o más entre dos proteínas se considera como una indicación de equivalencia funcional.

5 El "fragmento" referido anteriormente debería consistir en al menos m aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos y, dependiendo de la secuencia particular, m es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o más). Preferentemente, el fragmento comprende un epítipo de una secuencia de aminoácidos. Los fragmentos preferidos son los desvelados en las referencias 8 y 9.

Los fragmentos preferidos son truncamientos en el C- o el N-terminal (p. ej., $\Delta 1-287$, $\Delta 2-287$ etc.).

10 Las secuencias preferidas omiten secuencias de poliglicina. Se ha encontrado que esto ayuda a la expresión [ref. 2]. Las secuencias de poliglicina pueden representarse como (Gly) g , donde $g \geq 3$ (p. ej., 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más). Si una porción -X- incluye una secuencia de poliglicina en su forma natural, se prefiere omitir esta secuencia en las proteínas híbridas de la invención. Esto es posible mediante la alteración o eliminación de la (Gly) g - mediante
15 deleción (p. ej., CGGGGS- \rightarrow CGGGS, CGGS, CGS o CS), mediante sustitución (p. ej., CGGGGS- \rightarrow CGXGGS, CGXXGS, CGXGXS etc.), y/o mediante inserción (p. ej., CGGGGS- \rightarrow CGGXGGS, CGXGGGS, etc.). Se prefiere la deleción de (Gly) g , y la deleción de la porción N-terminal de una proteína hasta e incluyendo la secuencia de poliglicina (p. ej., deleción de los residuos 1-32 en la SEC ID 1) se refiere en el presente documento como " ΔG ". La omisión de poliglicina es particularmente útil para las proteínas 287 y 741 ($\Delta G 287$ y $\Delta G 741$ - referencias 1 y 2).

Los fragmentos preferidos omiten dominios proteicos completos. Esto es particularmente útil para las proteínas 961 y 287. Una vez que una proteína se ha dividido hipotéticamente en dominios, los fragmentos pueden omitir uno o más de estos dominios (p. ej., 287B, 287C, 287BC, 961c - referencia 2; figuras 1 y 2 del presente documento).

20 La proteína 287 se ha dividido hipotéticamente en tres dominios, denominados A, B y C (véase la figura 5 de la referencia 2). El dominio B se alinea con proteasas de IgA, el dominio C se alinea con proteínas de unión a transferrina y el dominio A no muestra ningún alineamiento fuerte con las secuencias de las bases de datos. En la referencia 7 se desvela un alineamiento de formas polimórficas de 287.

La proteína 961 se ha dividido hipotéticamente en varios dominios (figura 1).

25 Si una porción -X- tiene una secuencia de péptido líder en su forma natural, esta puede incluirse u omitirse en las proteínas híbridas de la invención. Cuando el péptido líder se omite, este es un ejemplo preferido de un fragmento de secuencia de aminoácidos. En una realización, los péptidos líderes se suprimirán, a excepción del de la porción -X- localizada en el N-terminal de la proteína híbrida, es decir, el péptido líder de X_1 se mantendrá, pero los péptidos líderes de $X_2 \dots X_n$ se omitirán. Esto es equivalente a suprimir todos los péptidos líderes y utilizar el péptido líder de X_1 como porción -A-.
30

Cuando se usa 287 en forma completa, es preferible en el extremo C-terminal de una proteína híbrida; si va a usarse en el N-terminal, si se prefiere usar una forma ΔG de 287. De igual manera, cuando se usa 741 en forma completa, es preferible en el extremo C-terminal de una proteína híbrida; si va a usarse en el N-terminal, si se prefiere usar una forma ΔG de 741.

35 **Las porciones -L-**

Para cada n casos de [-X-L-], la secuencia -L- de engarce de aminoácidos puede estar presente o ausente. Cuando $n=2$, la híbrida puede ser $NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH$, etc.

40 La(s) secuencia(s) -L- de engarce de aminoácidos serán típicamente cortas (p. ej., 20 aminoácidos o menos, es decir, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, engarzadores de poliglicina (es decir, Gly $_n$ en la que $n=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), y etiquetas de histidina (es decir, His $_n$ en las que $n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos de engarce adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Un engarce útil es GSGGGG (SEC ID 27), donde el dipéptido Gly-Ser está formado a partir de un sitio de restricción para BamHI, ayudando así en
45 la clonación y manipulación, y el tetrapéptido Gly $_4$ es un engarce de poliglicina típico.

Si X_{n+1} es una proteína ΔG y L_n es un engarce de glicina, este puede ser equivalente a X_{n-1} sin ser una proteína ΔG y estando L_n ausente.

La porción -A-

50 -A- es una secuencia de aminoácidos opcional N-terminal. Esta será típicamente corta (p. ej., 40 aminoácidos o menos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias cortas de péptidos que facilitan la clonación o la purificación (p. ej., etiquetas de histidina, es decir His $_n$, donde $n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos N terminales adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Si X_1 carece de su propia metionina N-terminal, -A- puede ser un resto de metionina.

La porción -B-

5 -B- es una secuencia de aminoácidos opcional N-terminal. Esta será típicamente corta (p. ej., 40 aminoácidos o menos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias cortas de péptidos que facilitan la clonación o la purificación (p. ej., que comprenden etiquetas de histidina, es decir His_n, donde n= 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), o secuencias que aumentan la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácidos del extremo C-terminal adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica.

Formas polimórficas de las proteínas

10 La invención puede usar secuencias de aminoácidos de cualquier cepa de *N. meningitidis*. Las referencias a una proteína particular (p. ej., "287", u "ORF46.1") incluyen, por tanto, esa proteína de cualquier cepa.

Las secuencias de referencia del serogrupo B de *N. meningitidis* incluyen:

Proteína	Referencia	Proteína	Referencia
orf46	Ref. 6, SEC ID 1049	961	Ref. 5, SEC ID 940
953	Ref. 5, SEC ID 2918	287	Ref. 5, SEC ID 3104
741	Ref. 5, SEC ID 2536	936	Ref. 5, SEC ID 2884
919	Ref. 5, SEC ID 3070		

15 La referencia 7 desvela formas polimórficas de las proteínas ORF46, 287, 919 y 953. Las formas polimórficas de 961 se desvelan en las referencias 10 y 11 Cualquiera de estas formas polimórficas de 287, 953 o 961 pueden usarse de acuerdo con la presente invención.

Serogrupos y cepas

20 Las proteínas preferidas de la invención comprenden porciones -X- que tienen una secuencia de aminoácidos que se encuentra en el serogrupo B de *N. meningitidis*. Dentro de una única proteína de la invención, las porciones individuales -X- pueden ser de una o más cepas. Por ejemplo, X₂ puede ser de la misma cepa que X₁ o de una cepa diferente.

Dentro del serogrupo B, las porciones -X- preferidas son de las cepas 2996, MC58, 95N477 o 394/98. La cepa 95N477 se denomina a veces en el presente documento "ET37", siendo este su tipo electroforético. La cepa 394/98 se denomina a veces en el presente documento "nz", ya que es una cepa de Nueva Zelanda.

25 Donde se usa una forma de 287, esta es, preferentemente, de la cepa 2996 o de la cepa 394/98.

Donde se usa una forma de 741, esta es, preferentemente, de las cepas MC58, 2996, 394/98 o 95N477 del serogrupo B, o de la cepa 90/18311 del serogrupo C.

Donde se usa una forma de 961, esta es, preferentemente, de la cepa 2996.

30 Las cepas se indican como un subíndice, p. ej., 741_{MC58} es la proteína 741 de la cepa MC58. A menos que se establezca de otra forma, las proteínas mencionadas en el presente documento (p. ej., sin subíndice) son de la cepa 2996 de *N. meningitidis*, que puede tomarse como cepa de "referencia". Se entenderá, sin embargo, que la invención no está, en general, limitada por la cepa. Como se menciona anteriormente, pueden tomarse las referencias generales a una proteína (p. ej., "287", "919" etc.) para incluir esa proteína de cualquier cepa. Esta tendrá, típicamente, una identidad de secuencia con 2996 del 90 % o más (p. ej., 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más).

Huésped heterólogo

40 Aunque la expresión de las proteínas de la invención puede tener lugar en *Neisseria*, la presente invención utiliza, preferentemente, un huésped heterólogo. El huésped heterólogo puede ser procarionta (p. ej., una bacteria) o eucariota. Es preferentemente *E. coli*, pero otros huéspedes adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, micobacterias (p. ej., *M. tuberculosis*), levaduras, etc.

Vectores, etc.

5 También se desvelan en el presente documento (a) ácidos nucleicos que codifican las proteínas descritas anteriormente, (b) vectores que comprenden estas secuencias de ácido nucleico, (c) células huésped que contienen dichos vectores. Estas composiciones pueden ser para uso como medicamentos (p. ej., vacunas). La invención incluye el uso de las composiciones definidas en las reivindicaciones en la fabricación de un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de bacterias de *Neisseria*, o de anticuerpos generados contra bacterias de *Neisseria* y/o un reactivo que pueda generar anticuerpos contra las bacterias de *Neisseria*.

10 La ejecución de la invención implicará típicamente las etapas básicas de: obtención de un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína, obtención de un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína y ligamiento del primer y segundo ácidos nucleicos. El ácido nucleico resultante puede insertarse en un vector de expresión, o puede ya formar parte de un vector de expresión.

Para mejorar la solubilidad, la purificación de las proteínas híbridas puede implicar las técnicas de renaturalización desveladas en el presente documento.

Composiciones y medicamentos inmunógenos

15 Las composiciones de la invención son preferentemente composiciones inmunógenas, y son más preferentemente, composiciones vacunales. El pH de la composición está preferentemente entre 6 y 7. El pH puede mantenerse mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril.

Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser, bien profilácticas (es decir, para prevenir la infección), o bien terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero serán típicamente profilácticas.

20 La invención también proporciona una composición de la invención para uso como un medicamento o un reactivo de diagnóstico. el medicamento es preferentemente capaz de generar una respuesta inmunitaria en un mamífero (es decir, es una composición inmunógena) y es más preferentemente una vacuna.

La invención también proporciona el uso de una composición de la invención en la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El medicamento es más preferentemente una vacuna.

25 También se desvela en el presente documento un método para generar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende la etapa de administración de una cantidad eficaz de la composición de la invención. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora. El método puede generar una respuesta de refuerzo.

30 El mamífero es preferentemente un ser humano. Donde la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (p. ej., un bebé o un niño pequeño), donde la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna prevista para niños también puede administrarse a adultos, p. ej., para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

Estos usos y métodos son preferentemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por una *Neisseria* (p. ej., meningitis, septicemia, gonorrea, etc.). Se prefiere la prevención y/o el tratamiento de la meningitis bacteriana.

35 **Otros componentes de la composición**

Además de los componentes mencionados anteriormente, la composición de la invención comprenderá típicamente uno o más "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo receptor de la composición. Típicamente, son vehículos adecuados macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trehalosa (documento WO00/56365) y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos por quienes tienen experiencia habitual en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares. En *Remington's Pharmaceutical Sciences* se dispone de una discusión completa de los excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 Las composiciones inmunógenas usadas como vacunas comprenden una cantidad de antígeno inmunológicamente eficaz, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según se necesiten. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única, o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la condición de salud y física del individuo para tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo para tratar (p.ej., primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica por el doctor responsable, y otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad caiga dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. La dosificación del tratamiento puede ser

una pauta de dosis única o una pauta de dosis múltiple (p. ej., incluyendo las dosis de refuerzo). La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

5 La composición puede incluir otros adyuvantes además de (o en lugar de) la sal de aluminio. Los adyuvantes preferidos para aumentar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a: (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo (a) MF59™ (documento WO90/14837, capítulo 10, en la ref. 12), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (conteniendo opcionalmente MTP-PE) formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidificador, (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero plurónico bloqueado L121 al 5 % , y thr-MDP, bien microfluidificado en una emulsión submicrométrica, o bien agitado con agitador vortical para generar una emulsión de partículas de mayor tamaño, y (c) el sistema adyuvante Ribit™ (RAS, *Ribit™ adjuvant system*), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (DMT) y esqueleto de la pared celular (EPC), preferentemente MPL + EPC (Detox™); (2) pueden usarse adyuvantes de saponina, tales como QS21 o Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), o partículas generadas a partir de ellos, tales como ISCOM (*immunostimulating complexes*, complejos inmunoestimuladores), ISCOM que pueden estar desprovistos de detergente adicional, p. ej., documento WO00/07621; (3) Adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF); (4) citocinas, tales como interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc), interferones (p. ej., interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (FEC-M), factor de necrosis tumoral (FNT), etc; (5) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL), p. ej., documentos GB-2220221, EP-A-0689454; (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, p. ej., documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG [Krieg Vaccine 2000, 19, 618-622; Krieg Curr opin Mol Ther 2001 3:15-24; Roman y col., Nat. Med. 1997, 3, 849-854; Weiner y col., PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis y col., J. Immunol., 1998, 160, 870-876; Chu y col., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford y col., Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu y col., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg y col., Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman y col., PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas y col., J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery y col. J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern y col., Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto y col., Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey y col., J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina y col., J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi y col., J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi y col., J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi y col., J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; y Yi y col., J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906; documentos de solicitud de patente internacional WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581] es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, usando opcionalmente 5-metilcitosina en lugar de citosina; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno p. ej., documento WO99/52549; (9) un tensioactivo de éster de sorbitán de polioxietileno en combinación con un octoxinol (p. ej., documento WO01/21207) o un tensioactivo de éster o éter de alquilo de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como un octoxinol (p. ej., documento WO01/21152); (10) un oligonucleótido inmunoestimulador (p. ej., un oligonucleótido CpG) y una saponina p. ej., documento WO00/62800; (11) un inmunoestimulador y una partícula de sal metálica p. ej., documento WO00/23105; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua, p. ej., documento WO99/11241; (13) una saponina (p. ej., QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) p. ej., documento WO98/57659; (14) otras sustancias que puedan actuar como agentes inmunoestimuladores para aumentar la eficacia de la composición.

45 Los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina -2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc.

Otros antígenos

Otros antígenos que pueden incluirse en la composición de la invención incluyen:

- 50 - una preparación de vesículas de membrana externa (VME) del serogrupo B de *N. meningitidis*, tales como las que se desvelan en las refs. 13, 14, 15, 16 etc.
- un antígeno de sacárido de los serogrupos A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*, tal como el oligosacárido desvelado en la ref. 17 del serogrupo C [véase también la ref. 8] o los oligosacáridos de la ref. 19.
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [p. ej., refs. 20, 21, 22].
- 55 - un antígeno proteico de *Helicobacter pylori* tal como CagA [p. ej., 23], VacA [p. ej., 23], NAP [p. ej., 24], HopX [p. ej., 25], HopY [p. ej., 25] y/o ureasa.
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [p. ej., 26, 27].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y del núcleo [p. ej., 27, 28].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [p. ej., 29].
- 60 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina tosferínica (TT, toxina tosferínica) y la hemaglutinina filamentosa (HAF) de *B. pertussis*, opcionalmente, también en combinación con pertactina y/o los aglutinógenos 2 y 3 [p. ej., refs. 30 y 31].

- un antígeno diftérico, tal como un toxoide diftérico [p. ej., capítulo 3 de la ref. 32] p. ej., el mutante CRM₁₉₇ [p. ej., 33].
- un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [p. ej., capítulo 4 de la ref. 32].
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [p. ej., 18].
- 5 - un antígeno de *N. gonorrhoeae* [p. ej., 3, 4, 5].
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [p. ej., 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [p. ej., 41].
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [p. ej., 42].
- antígeno(s) de polio [p. ej., 43, 44], tales como IPV u OPV.
- 10 - antígeno(s) de la rabia [p. ej., 45], tales como virus inactivados liofilizados [p. ej., 46, RabAvert™].
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubeola [p. ej., capítulos 9, 10 y 11 de la ref. 32].
- antígeno(s) de la gripe [p. ej., capítulo 19 de la ref. 32], tales como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [p. ej., 47].
- 15 - un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [p. ej., 48, 49].
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus agalactiae*
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [p. ej., 49, 50, 51 11].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [p. ej., 52].

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

- 20 Donde se usa un antígeno de sacárido o de carbohidrato, se conjuga preferentemente con una proteína transportadora para aumentar la inmunogenicidad [p. ej., refs. 53 a 62]. Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoides diftéricos o tetánicos. Se prefiere particularmente el toxoide diftérico CRM₁₉₇. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [p. ej., 63], proteínas de choque térmico [p. ej., 66], proteínas de tos ferina [p. ej., 67, 68], la proteína D de *H. influenzae* [p. ej., 69], las toxinas A o B de *C. difficile* [p. ej., 70], etc. Donde una mezcla comprende sacáridos capsulares tanto del serogrupo A como del C, se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenA: sacárido MenC sea mayor que 1 (p. ej., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, o superior). Los sacáridos de los diferentes serogrupos de *N. meningitidis* pueden conjugarse con las mismas o con diferentes proteínas transportadoras.

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier engarce adecuado cuando sea necesario.

- 30 Los antígenos proteicos tóxicos pueden destoxificarse cuando sea necesario (p. ej., destoxicación de la toxina tosferínica por medios químicos y/o genéticos [31]).

- 35 Cuando se incluye un antígeno diftérico en la composición, se prefiere también incluir antígenos tetánicos y tosferínicos. De igual manera, cuando se incluye un antígeno tetánico, se prefiere también incluir antígenos diftéricos y tosferínicos. De igual manera, cuando se incluye un antígeno tosferínico, se prefiere también incluir antígenos diftéricos y tetánicos.

Los antígenos se mezclan preferentemente con (y, más preferentemente, se adsorben a) una sal de aluminio (p. ej., fosfato, hidróxido, hidroxifosfato, oxihidróxido, ortofosfato, sulfato). La sal puede tomar cualquier forma adecuada (p. ej., gel, cristalina, amorfa, etc.).

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

- 45 Como alternativa al uso de proteínas antigénicas en la composición de la invención, pueden usarse ácidos nucleicos que codifiquen el antígeno [p. ej., refs. 71 a 79]. Los componentes proteicos de las composiciones de la invención pueden, por tanto, reemplazarse por ácido nucleico (preferentemente ADN, p. ej., en forma de plásmido) que codifique la proteína.

Definiciones

La expresión "que comprende" significa "que incluye", así como "que consiste", p. ej., una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, p. ej., X + Y.

La expresión "alrededor de" en relación con un valor numérico significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

- 50 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra 9 dominios dentro de 961₂₉₉₆, y la figura 1 muestra cómo se han manipulado estos.

Modos para llevar a cabo la invención

Proteínas híbridas - X₁ = ΔG287

Además de las que se desvelan en las referencias 1 y 2, se construyeron siete proteínas híbridas con ΔG287 de la cepa 2996 en el extremo N-terminal. También se fabricaron siete proteínas 287 en tándem (véase más adelante).

Nº	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	ΔG287	-	230	(His) ₆
2	2		-	936	(His) ₆
3	2		-	741 _{MS58}	(His) ₆
4	2		-	741 _{ET37}	(His) ₆
5	2		-	741 _{90/18311}	(His) ₆
6	2		-	741 _{95N477}	(His) ₆
7	2	ΔG287 _{nz}	-	741 _{MC58}	(His) ₆

5

Estas proteínas tuvieron como adyuvante bien adyuvante completo de Freund (ACF) o bien 3 mg/ml de alumbre, y se usaron para inmunizar ratones. Los sueros resultantes se ensayaron contra diversas cepas de *Neisseria* usando el ensayo bactericida. Los valores de dilución utilizados con la proteína n.º 3 fueron los siguientes:

Cepa ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Hidróxido de Al	8192	32768	8192	>2048	16384	8192
FCA	16384	262144	8192	>2048	>32768	8192

10 En otros experimentos en los que se usó la proteína n.º 3 con hidróxido de aluminio como adyuvante, los títulos de ELISA anti-287 y anti-741 excedieron cada uno 984150 y los títulos de BCA fueron los siguientes:

2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(C)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
8000	65000	4000	4000	32000	8000	16000

Los resultados obtenidos tras la inmunización con las proteínas desveladas en las refs. 1 y 2, ensayadas contra la cepa homóloga, fueron los siguientes:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Título bactericida		ELISA	
					FCA	Alumbre	FCA	Alumbre
2	ΔG287 _{394/98}	-	961	(His) ₆	-	32768	-	>109350
			919		32768	4096	4718	3678
			953		>32768	>16384	1900	6936
			741		16384	2048	232	862
2	ΔG287 ₂₉₉₆	-	961	(His) ₆	65536	32768	108627	>109350
			919		128000	32000	11851	2581
			953		65536	-	3834	-
			741		16384	8192	315	4645

15

Proteínas híbridas - X₁ = 936

Además de las que se desvelan en las referencias y 2, se construyeron siete proteínas híbridas con 936 en el extremo N-terminal:

Nº	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	936	-	ORF46.1	(His) ₆
2	2		-	961	(His) ₆
3	2		-	741 _{ET37}	(His) ₆
4	2		-	741 _{MC58}	(His) ₆
5	2		-	741 _{90/18311}	(His) ₆
6	2		-	741 _{95N477}	(His) ₆
7	2		-	741	(His) ₆

- 5 Estas proteínas tuvieron como adyuvante bien adyuvante completo de Freund (ACF) o bien 3 mg/ml de alumbre, y se usaron para inmunizar ratones. Los sueros resultantes se ensayaron contra diversas cepas de *Neisseria* usando el ensayo bactericida. Los títulos utilizados con la proteína n.º 2 fueron los siguientes:

Cepa ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Hidróxido de Al	16384	32768	1024	2048	<16
FCA	65536	65536	>2048	8192	2048 (36 %)

Los títulos utilizados con la proteína n.º 4 fueron los siguientes:

Cepa ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Hidróxido de Al	256	>262144	>2048	32768	8192
FCA	1024	>262144	>2048	>32768	>32768

10

Los títulos utilizados con la proteína n.º 7 fueron los siguientes:

Cepa ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
Hidróxido de Al	256	130000	16000	32000	8000	16000

Los resultados obtenidos tras la inmunización con las proteínas desveladas en las refs. 1 y 2, ensayadas contra la cepa homóloga, fueron los siguientes:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Título bactericida		ELISA	
					FCA	Alumbre	FCA	Alumbre
2	936	-	741	(His) ₆	1024	256	1466	5715
			936		>32768	>32768	>109350	>109350

15

Mezclas de proteínas híbridas

Se inmunizaron ratones con las tres proteínas con hidróxido de aluminio como adyuvante, bien solo o bien en una combinación triple: (1) 287_{Nz}-953; (2) 936-741; y (3) 961c. La mezcla fue capaz de inducir altos títulos bactericidas

contra diversas cepas:

	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C11 ^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000
mezcla	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
(X)	4000	4000	1000	1000	>4000	1000	4000	n.d.

'-' indica que esta cepa no contiene el gen NadA
(X) era una combinación de la proteína 287 con vesículas de membrana externa, para comparar

Considerando los ratones individualmente, la mezcla indujo títulos bactericidas elevados y uniformes:

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	18192	65536	32768	132768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

5 Delección de dominios -961

961 no está presente en la secuencia del genoma del serogrupo A de *N. meningitidis* [80], aun cuando las regiones circundantes estén conservadas (> 90 %) entre los serogrupos A y B. Las referencias 10 y 11 desvelan formas polimórficas de 961. Se encontró que el gen estaba presente en el 91 % de las cepas del serogrupo B pertenecientes a los linajes hipervirulentos ET-5, ET-37 y el grupo A4, pero estaba ausente en todas las cepas ensayadas del linaje 3. La mayoría de las cepas del serogrupo C ensayadas fueron positivas aunque no perteneciesen a linajes hipervirulentos. Lo mismo ocurrió con las cepas del serogrupo B con serotipos 2a y 2b. Para el serogrupo A, una cepa perteneciente al subgrupo III fue positiva, mientras que las otras dos cepas pertenecientes al subgrupo IV-1 fueron negativas. 961 estaba ausente en *N. gonorrhoeae* y en las especies comensales *N. lactamica* y *N. cinerea*.

15 Las figuras 1 y 2 muestran dominios en la proteína 961.

Cuando la región anclada (dominio 9) de la proteína 961 se suprime ("961cL") y se expresa en *E. coli*, la proteína se exporta al periplasma y se segrega en el sobrenadante del cultivo.

20 Para investigar esto más, se construyeron mutantes de delección en la región C-terminal de 961 (961cL-Δaro, 961cLΔcc, 961aL, 961aL-Δ1, 961aL-Δ2, 961aL-Δ3) sobre la base de aspectos estructurales (delecciones de residuos aromáticos en los casos del mutante 961cLΔaro, y de las regiones de superenrollamiento para los otros). Se analizaron con respecto a expresión y secreción al periplasma y al sobrenadante del cultivo. En todos estos mutantes de delección, la proteína se produce en gran cantidad, está presente en la fracción periplásmica y se libera al sobrenadante del cultivo.

Referencias

- 25 1 - Solicitud de patente internacional WO01/64920.
 2 - Solicitud de patente internacional WO01/64922.
 3 - Solicitud de patente internacional WO99/24578.
 4 - Solicitud de patente internacional WO99/36544.
 5 - Solicitud de patente internacional WO99/57280.
 30 6 - Solicitud de patente internacional WO00/22430.
 7 - Solicitud de patente internacional WO00/66741.
 8 - Solicitud de patente internacional WO00/71574.
 9 - Solicitud de patente internacional WO01/04316.
 10 - Solicitud de patente internacional PCT/IB02/03396.
 35 11 - Comanducci y col. (2002) J Exp Med 195:1445-1454.
 12 - Vaccine Design: subunit & adjuvant approach (1995) Powell y Newman (ISBN: 030644867X).

- 13 - Solicitud de patente internacional WO01/52885.
 14 - Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
 15 - Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:295-2958.
 5 16 - Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
 17 - Costantino y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
 18 - Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
 19 - Solicitud de patente internacional PCT/IB02/03191.
 20 - Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 21 - Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
 10 22 - Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207
 23 - Solicitud de patente internacional WO93/18150.
 24 - Solicitud de patente internacional WO99/53310.
 25 - Solicitud de patente internacional WO98/04702.
 26 - Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
 15 27 - Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
 28 - Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Supl: S63-68 y 79-80.
 29 - Hsu y col. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
 30 - Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 31 - Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 20 32 - *Vaccines* (1988) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 33 - Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
 34 - Solicitud de patente internacional WO00/02606.
 35 - Kalman y col. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
 36 - Read y col. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
 25 37 - Shirai y col. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
 38 - Solicitud de patente internacional WO99/27105.
 39 - Solicitud de patente internacional WO00/27994.
 40 - Solicitud de patente internacional WO00/37494.
 41 - Solicitud de patente internacional WO99/28475.
 30 42 - Ross y col. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
 43 - Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 44 - Zimmerman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
 45 - Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Supl: S2-6.
 46 - *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16; 47(1):12, 19.
 35 47 - McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S101-107.
 48 - Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
 49 - Documento WO02/34771.
 50 - Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 51 - Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 40 52 - Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
 53 - Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
 54 - Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl 2:S28-36.
 55 - Buttery y Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
 56 - Ahmad y Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
 45 57 - Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol* 47:563-567.
 58 - Patente europea 0 477 508.
 59 - Patente de Estados Unidos 5.306.492.
 60 - Solicitud de patente internacional WO98/42721.
 61 - *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.
 50 62 - Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 o 012342335X.
 63 - Solicitud de patente europea 0372501.
 64 - Solicitud de patente europea 0378881.
 65 - Solicitud de patente europea 0427347.
 66 - Solicitud de patente internacional WO93/17712.
 55 67 - Solicitud de patente internacional WO98/58668.
 68 - Solicitud de patente europea 0471177.
 69 - Solicitud de patente internacional WO00/56360.
 70 - Solicitud de patente internacional WO00/61761.
 71 - Robinson y Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
 60 72 - Donnelly y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
 73 - Scott-Taylor y Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
 74 - Apostolopoulos y Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
 75 - Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
 76 - Dubensky y col. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
 65 77 - Robinson y Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
 78 - Donnelly y col. (2000) *Am JRespir Crit Care Med* 162(4 Pt 2): S 190-193.

79 - Davis (1999) Mt. Sinai J. Med. 66:84-90.
 80 - Parkhill y col. (2000) Nature 404:502-506.

Listado de secuencias

5 <110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
 <120> Expresión híbrida y en tándem de proteínas procedentes de *Neisseria*
 <130> P055437EP
 10 <140> EP
 <141> 06-09-2002
 <150> GB 0121591.2
 <151> 06-09-2001
 15 <160> 4
 <170> SeqWin99, versión 1.02
 <210> 1
 20 <211> 579
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223>Proteína híbrida
 <400> 1

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu Val Lys Glu Asp Ala Pro
 20 25 30
 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Thr Gln Gly Ser Gln
 35 40 45
 Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
 50 55 60
 Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met
 65 70 75 80
 Pro Gln Asn Ser Ala Glu Ser Ala Asn Gln Thr Gly Asn Asn Gln Pro
 85 90 95
 Ala Asp Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn
 100 105 110
 Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile
 115 120 125
 Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser
 130 135 140
 Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu
 145 150 155 160
 Phe Glu Asn Leu Asn Glu Ser Glu Arg Ile Glu Lys Tyr Lys Lys Asp
 165 170 175
 Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val Ala Thr Ala Val Gln Ala

30

ES 2 556 770 T3

180					185					190					
Asn	Gly	Thr	Asn	Lys	Tyr	Val	Ile	Ile	Tyr	Lys	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser
		195					200					205			
Ser	Ser	Ser	Ala	Arg	Phe	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu
	210					215					220				
Pro	Ala	Glu	Met	Pro	Leu	Ile	Pro	Val	Asn	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile
225					230					235					240
Val	Asp	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Ile	Phe
				245					250					255	
Ala	Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu	Lys	Leu
			260					265					270		
Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Leu	Arg	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly
		275					280					285			
Glu	Met	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	His	Phe
	290					295					300				
His	Thr	Glu	Asn	Gly	Arg	Pro	Tyr	Pro	Thr	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Ala
305					310					315					320
Lys	Val	Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser	Gly
				325					330					335	
Asp	Asp	Leu	His	Met	Gly	Thr	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Gly
		340						345					350		
Asn	Gly	Phe	Lys	Gly	Thr	Trp	Thr	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly	Asp	Val	Ser
		355					360						365		
Gly	Arg	Phe	Tyr	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ser
	370					375					380				
Tyr	Arg	Pro	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gly
385					390					395					400
Lys	Lys	Glu	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Lys	Val
				405					410					415	
Asp	Glu	Tyr	His	Ala	Asn	Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Asp	His	Phe	Asn	Thr
			420					425					430		
Ser	Thr	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Tyr	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Val	Glu	Phe
		435					440					445			
Asp	Gln	Ala	Lys	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Asp	Ile	Thr	Ile	Pro	Val	Ala
	450					455					460				
Asn	Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Gln	His	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Ser	Ala
465					470					475					480
Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Pro	Asp	Ile	Arg	Phe	Val	Ser	Thr
				485					490					495	
Lys	Phe	Asn	Phe	Asn	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ser	Val	Asp	Gly	Asn	Leu
			500					505					510		

ES 2 556 770 T3

Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe
 515 520 525
 Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp
 530 535 540
 Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu Val
 545 550 555 560
 Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala
 565 570 575

Ala Lys Gln

<210> 2
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteina híbrida

<400> 2

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro
 20 25 30
 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln
 35 40 45
 Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
 50 55 60
 Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
 65 70 75 80
 Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
 85 90 95
 Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala
 100 105 110
 Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala
 115 120 125
 Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly
 130 135 140
 Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala
 145 150 155 160
 Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser
 165 170 175
 Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
 180 185 190

5

10

Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
 195 200 205
 Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe
 210 215 220
 Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly
 225 230 235 240
 Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser
 245 250 255
 Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys
 260 265 270
 Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
 275 280 285
 Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
 290 295 300
 Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile
 305 310 315 320
 Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
 325 330 335
 Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys
 340 345 350
 Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
 355 360 365
 Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala
 370 375 380
 Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 405 410 415
 Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
 420 425 430
 Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 435 440 445
 Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460
 Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys
 465 470 475 480
 Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495
 Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510
 Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val

ES 2 556 770 T3

Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr
 145 150 155 160

Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln
 165 170 175

Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val
 180 185 190

Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr Val Gln Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 195 200 205

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 210 215 220

Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
 225 230 235 240

Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 245 250 255

Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 260 265 270

Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
 275 280 285

Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His
 290 295 300

Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala
 325 330 335

Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr
 340 345 350

Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr
 355 360 365

Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His
 370 375 380

Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys
 385 390 395 400

Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn
 405 410 415

Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala
 420 425 430

Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg
 435 440 445

His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 450 455

<210> 4
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 4

5

```

Met Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile
 1          5          10          15

Ala Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly
 20          25          30

Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp
 35          40          45

Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu
 50          55          60

Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln
 65          70          75          80

Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu
 85          90          95

Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala
 100         105         110

Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile
 115         120         125

Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu
 130         135         140

Lys Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe
 145         150         155         160

Asn Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu
 165         170         175

Ala Val Lys Thr Ala Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys
 180         185         190

Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys
 195         200         205

Ala Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu
 210         215         220

Ala Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn
 225         230         235         240

Lys Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg
 245         250         255

Glu Glu Ser Asp Ser Lys Phe Val Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr
 260         265         270

Thr Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala

```

ES 2 556 770 T3

		275						280											285
Asp	His	Asp	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu				
	290					295					300								
Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly				
305					310					315					320				
Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly												
				325															

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende las siguientes proteínas:

(1) $\text{NH}_2\text{-A-[X-L]}_n\text{-B-COOH}$, en la que $n=2$, $X_1=287$, $X_2=953$

(2) 961

(3) $\text{NH}_2\text{-A-[X-L]}_n\text{-B-COOH}$, en la que $n=2$, $X_1=936$, $X_2=741$,

en la que 287 es la SEC ID N°: 3104 del documento WO99/57280 o una proteína que tiene una identidad de secuencia de un 80 % o más con ella, 953 es la SEC ID N°: 2918 del documento WO99/57280 o una proteína que tiene una identidad de secuencia de un 80 % o más con ella, 961 es la SEC ID N°: 940 del documento WO99/57280 o una proteína que tiene una identidad de secuencia de un 80 % o más con ella, 936 es la SEC ID N°: 2884 del documento WO99/57280 o una proteína que tiene una identidad de secuencia de un 80 % o más con ella, 741 es la SEC ID N°: 2536 del documento WO99/57280 o una proteína que tiene una identidad de secuencia de un 80 % o más con ella, y en la que cada L es una secuencia de aminoácidos engarzadora opcional, A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional y B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional.

2. La composición de la reivindicación 1 en la que la proteína (2) comprende la SEC ID 4, la proteína (1) comprende la SEC ID 1 o la SEC ID 2, y la proteína (3) comprende la SEC ID 3.

3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende, además:

- un antígeno proteico de *N. meningitidis*;
- una preparación de vesícula de membrana externa (VME) de *N. meningitidis*;
- un antígeno de sacárido de *N. meningitidis*;
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae*;
- un antígeno de los virus de la hepatitis A, B o C;
- un antígeno de *Bordetella pertussis*;
- un antígeno diftérico
- un antígeno tetánico
- un antígeno proteico de *Helicobacter pylori*;
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae*;
- un antígeno de *N. gonorrhoeae*;
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae*;
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis*;
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis*;
- antígeno(s) de polio;
- antígeno(s) de la rabia;
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubeola;
- antígeno(s) de gripe;
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis*;
- un antígeno de *Streptococcus agalactiae*;
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes*; y/o
- un antígeno de *Staphylococcus aureus*.

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. La composición de la reivindicación 4 para su uso como medicamento.

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que la composición es una vacuna.

7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por una *Neisseria*.

8. El uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar una enfermedad causada por una *Neisseria*.

9. La composición de la reivindicación 7 o el uso de la reivindicación 8, en la que la enfermedad es meningitis bacteriana.

FIGURA 1

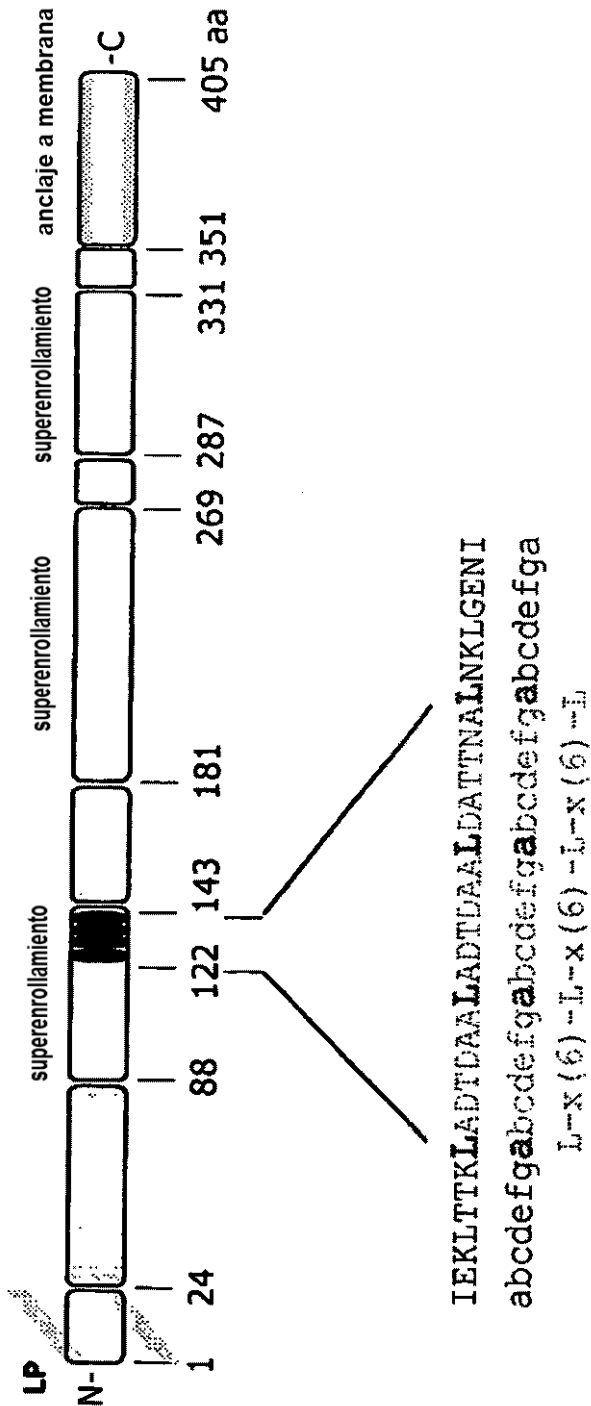


FIGURA 2

