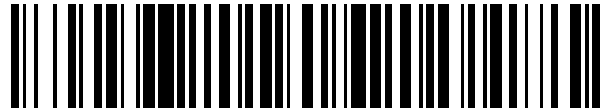


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 282**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2009 E 09720813 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2265640**

54 Título: **Proteínas quiméricas de unión al factor H (fHBP) que contienen un dominio B heterólogo, y métodos de uso**

30 Prioridad:

10.03.2008 US 35329 P
17.03.2008 US 37252 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2016

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER
AT OAKLAND (100.0%)
747 52nd Street
Oakland, CA 94609, US**

72 Inventor/es:

**GRANOFF, DAN;
BEERNINK, PETER y
WELSCH, JO ANNE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 557 282 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

Proteínas quiméricas de unión al factor H (fHBP) que contienen un dominio B heterólogo, y métodos de uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas para enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis*.

10 **Antecedentes**

10 *Neisseria meningitidis* es una bacteria Gram-negativa que coloniza el tracto respiratorio superior humano y es responsable de brotes epidémicos esporádicos y cíclicos en todo el mundo, principalmente, de meningitis y sepsis. Las tasas de ataque y morbilidad son más elevadas en los niños menores de 2 años de edad. Al igual que otras bacterias Gram-negativas, por lo general, *Neisseria meningitidis* posee una membrana citoplasmática, una capa de peptidoglicano, una membrana externa que, junto con el polisacárido capsular constituye la pared bacteriana, y pili, que se proyectan hacia el ambiente exterior. Las cepas encapsuladas de *Neisseria meningitidis* son una causa principal de meningitis bacteriana y septicemia en niños y adultos jóvenes. La prevalencia y la importancia económica de las infecciones por *Neisseria meningitidis* invasoras han impulsado la búsqueda de vacunas eficaces que puedan conferir inmunidad a través de diferentes cepas, y, en particular, a través de cepas del grupo B genéticamente diversas con diferentes serotipos o serosubtipos.

25 La proteína de unión al factor H (fHBP, también denominada en la técnica lipoproteína 2086 (Fletcher *et al*, *Infect Immun* 2004; 72: 2088-2100), el antígeno de *Neisseria* derivado del genoma (GNA) 1870 (Masignani *et al.*, *J Exp Med* 2003; 197:789-99) o "741"), es una proteína de *N. meningitidis* que se expresa en la bacteria en forma de una lipoproteína expuesta a la superficie. Basándose en el análisis de secuencias de 71 cepas de *N. meningitidis* representativas de su diversidad genética y geográfica, las cepas de *N. meningitidis* se han subdividido en tres grupos de variantes de fHBP (denominadas variante 1 (v.1), variante 2 (v.2) y variante 3 (v.3)), basándose en la variabilidad de las secuencias de aminoácidos y en la reactividad inmunológica cruzada (Masignani *et al* *J Exp Med* 2003; 197:789-99). Otros investigadores (Fletcher *et al*, 2004) han subdividido la proteína en dos subfamilias designadas A (que incluye v.2 y v.3 de Masignani) y B (v.1). Las cepas de la variante 1 representan aproximadamente el 60 % de los aislados del grupo B que producen enfermedades (Masignani *et al.* 2003, *supra*). Dentro de cada grupo de variantes, hay conservación de la secuencia de aminoácidos del orden de aproximadamente un 92 % o superior. En concreto, la conservación dentro de cada grupo de variantes varía entre el 89 y el 100 %, mientras que entre los grupos de variantes (por ejemplo, entre v.1 y v.2), la conservación puede ser tan baja como del 59 %. La proteína es expresada por todas las cepas conocidas de *N. meningitidis*.

40 Los ratones inmunizados con fHBP recombinante generaron altas respuestas de anticuerpos bactericidas séricos contra cepas que expresaban proteínas fHBP del grupo de variante homóloga (Masignani *et al.*, 2003, *supra*; Welsch *et al.*, 2004, *J Immunol.* 172(9):5606-15). Por lo tanto, el antisuero preparado contra la v.1 de fHBP confiere protección contra las cepas de *N. meningitidis* que expresan v.1 de fHBP, pero no contra las cepas que expresan la v.2 ni la v.3 de fHBP. Del mismo modo, el antisuero preparado contra la v.2 de fHBP protege contra las cepas que expresan la v.2 (o la v.3), pero no la v.1 (Masignani *et al.*, *J Exp Med* 2003, 197:789-99; Beernink *et al.*, *J Infect Dis* 2007; 195:1472-9). Con fines de vacunación, sería deseable disponer de una sola proteína que fuera capaz de generar anticuerpos con protección cruzada frente a fHBP de diferentes grupos de variantes.

45 Se han usado proteínas quiméricas para el desarrollo de vacunas de diversas maneras. Por ejemplo, una primera estrategia emplea un enlace genético o químico de un antígeno a una proteína inmunogénica conocida, pero no relacionada, tal como las proteínas de la difteria, del tétanos o del toxoide de la tos ferina, o el dominio de la toxina B del cólera (CTB), para aumentar la magnitud de las respuestas de los anticuerpos hacia el antígeno de interés. Una segunda estrategia usa una fusión genética de dos antígenos del mismo organismo para mejorar la protección cruzada contra cepas con diversidad antigénica (Giuliani *et al.*, *Infect Immun* 2005 73:1151-60). Un ejemplo es la vacuna de proteína recombinante meningocócica del grupo multivalente B, que contiene una mezcla de dos proteínas de fusión: una primera proteína de fusión de una proteína GNA2091 y de una proteína GNA1870 (o "fHBP"), y una segunda proteína de fusión de una proteína GNA2132 y de una proteína GNA1030 (Giuliani *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2006, 103:10834-9). Una tercera estrategia ha sido la de construir una fusión de diferentes variantes serológicas ("serovares") de un antígeno para inducir la protección cruzada contra cepas con diversidad antigénica. Un ejemplo es una vacuna tetravalente quimérica de OspC contra la enfermedad de Lyme, que indujo respuestas de anticuerpos bactericidas contra cepas de espiroqueta que expresaban cada uno de los tipos de OspC que se incorporaron en la construcción (Earnhart *et al.*, "Vaccine" 2007; 25:466-80).

60 En los ejemplos de vacunas quiméricas descritas que se diseñaron para ampliar las respuestas inmunes protectoras, las vacunas estaban compuestas de repeticiones de un dominio individual con variabilidad antigénica. Las respectivas variantes del dominio se expresaron en tándem en una proteína (es decir, el mismo dominio de diferentes cepas, A₁-A₂-A₃-A₄, etc.). En algunos casos, dichas proteínas recombinantes en tándem pueden ser convenientes para la fabricación y el control de calidad. Sin embargo, también pueden ser muy grandes y someterse a plegamiento o degradación inadecuados.

Una metodología para evitar el problema de las proteínas de fusión en tándem de gran tamaño es el diseño de un solo polipéptido que se componga de diferentes dominios de dos variantes antigénicas, por ejemplo, mediante el "intercambio" de diferentes dominios individuales de un antígeno, o regiones incluso menores tales como epítomos individuales de dos proteínas diferentes, para formar una proteína quimérica que exprese epítomos no relacionados antigénicamente específicos para más de una cepa (es decir, diferentes dominios de dos cepas diferentes, A₁-B₂ o -A₂-B₁, etc.).

Esta última metodología se realizó con fHBP. En primer lugar, para facilitar la identificación de las regiones bactericidas de fHBP, se dividió la proteína en tres dominios, designados A, B y C (Giuliani (2005) *Infect. Immun.* 73:1151-1160). El dominio A está muy conservado en los grupos de variantes, mientras que los dominios B y C contienen secuencias que difieren entre las cepas. Giuliani *et al.* identificaron un epítomo de fHBP que interacciona con un mAb bactericida ubicado en el dominio C de R204 (Giuliani (2005) *supra*). Sin embargo, una proteína quimérica que contiene el dominio B de una cepa de la variante 3 (B₃) fusionado con el dominio C de una cepa de la variante 1 (C₁) no pudo generar respuestas bactericidas de protección contra las cepas con fHBP v.1 ni con fHBP v.2. Véase también el documento WO 2006/024954 de los mismos autores. El documento WO 2007/060584 también se refiere a fHBP adicionales diseñadas por ingeniería genética en las que se pueden sustituir secuencias de una familia NMB 1870 a la posición correspondiente de otra familia.

Las vacunas que aprovechan la capacidad de las fHBP para generar respuestas de anticuerpos bactericidas y que pueden generar dichos anticuerpos que son eficaces contra las cepas que expresan diferentes variantes de fHBP siguen siendo de interés.

Sumario

Se proporcionan fHBP quiméricas que pueden generar anticuerpos que son bactericidas para diferentes cepas de variantes de fHBP de *N. meningitidis* y métodos de uso de acuerdo con las reivindicaciones.

La presente invención proporciona una proteína quimérica de unión al factor H (fHBP) que comprende del extremo N al extremo C:

- a) una primera secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGK (SEC ID n.º 1) de un dominio B de la variante 1 (v.1) de fHBP, en la que el dominio B comprende una secuencia GEHT; y
- b) ligada operativamente a a), una segunda secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua de una variante 2 (v.2) o una variante 3 (v.3) de fHBP;

en la que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos están ligadas operativamente en un punto de unión situado en un sitio no más de 13 restos N-terminal de la secuencia GEHT y no más de 34 restos C-terminal de la secuencia GEHT, en la que el punto de unión está ubicado en un dominio B para proporcionar un dominio B heterólogo o en un dominio C para proporcionar un dominio C heterólogo de la fHBP quimérica; fHBP quimérica que comprende el epítomo unido por el anticuerpo JAR 11 (ATCC PTA-8938) o el anticuerpo JAR 32 (ATCC PTA-8942);

en la que la fHBP quimérica comprende el epítomo unido por el anticuerpo JAR 5 (ATCC PTA-8941); en la que el punto de unión está ubicado en el dominio B, el punto de unión está ubicado en un sitio no más de 13 restos N-terminal de la secuencia GEHT y no más de 24 restos C-terminal con respecto a la secuencia GEHT; en la que cuando el punto de unión está ubicado en el dominio C, el punto de unión está ubicado en un sitio no más de 34 aminoácidos C-terminal con respecto a la secuencia GEHT.

En las reivindicaciones anexas, se definen características adicionales de la proteína quimérica de la invención.

La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica la fHBP quimérica de la invención y una célula hospedadora recombinante que contiene el ácido nucleico.

También se proporciona un método de producción de la fHBP quimérica de la invención, método que comprende cultivar la célula hospedadora recombinante de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la fHBP quimérica; y aislar la fHBP quimérica.

La invención proporciona además una composición inmunogénica que comprende una fHBP quimérica de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La fHBP quimérica de acuerdo con la invención y sus composiciones también se proporcionan para su uso en un método de vacunación de un mamífero.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una colección de resultados de análisis de transferencia Western que ilustran los restos de aminoácidos que participan en la unión de los anticuerpos monoclonales (mAb) JAR 3 y JAR 5 a la proteína de unión al factor H (fHBP). Grupo A, JAR 5; carril 1, patrón de masa molecular; carril 2, pET21b; carril 3, pET21-fHBP (MC58 de tipo silvestre); carril 4, pET21-fHBP(MC58)G121R; carril 5, pET21-fHBP (M6190 de tipo silvestre) R121; carril 6, pET21-fHBP (M6190) R121G. Grupo B, JAR 3. C, mAb Penta-His. Los grupos B y C tienen las mismas asignaciones de carril que el grupo A.

La Figura 2 es una serie de gráficas que ilustran que la unión de los mAb JAR 3 y JAR 5 a fHBP es competitiva. Se mide el porcentaje de inhibición competitiva de la unión de los mAb anti-fHBP a fHBP por un segundo anticuerpo mediante ELISA. Cada grupo incluye: antisuero anti-fHBP policlonal de conejo; suero preinmune de conejo; y un mAb de control negativo específico de un antígeno capsular irrelevante (JW-C2, -A2 o -A1). Grupo A, Inhibición de la unión de JAR 3 por JAR 4 o JAR 5. Grupo B, Inhibición de la unión de JAR 5 por JAR 3 o JAR 4. Grupo C, Inhibición de la unión de JAR 4 por JAR 3 o JAR 5.

La Figura 3 es un esquema que ilustra las posiciones de los restos asociados a los epítomos de los nueve mAb anti-fHBP (mAb "JAR") en el modelo estructural basado en datos de RMN previamente publicados (Cantini *et al.* "Solution structure of the immunodominant domain of protective antigen GNA1870 of *Neisseria meningitidis*". *J Biol Chem* 2006; 281:7220-7). Para construir el modelo, se usaron coordinados de la estructura en solución de los dominios B y C de la v.1 de fHBP de la cepa MC58. Cabe señalar que, en el modelo, se muestran las posiciones de los restos de aminoácidos implicados en los epítomos para los anticuerpos generados contra las proteínas v.2 y v.3 fHBP, a pesar de que estos anticuerpos no se unen a la proteína v.1 de la cepa MC58. También cabe señalar que la numeración de los restos de aminoácidos se basa en la secuencia de proteína madura de fHBP (es decir, carece de la secuencia señal) de la cepa MC58. Dado que las secuencias de aminoácidos de la variante 2 (v.2) de la proteína fHBP (de la cepa 8047) y la variante 3 (v.3) de fHBP (de la cepa M1239) difieren en -1 y +7 restos de aminoácidos, respectivamente, de la de MC58, la numeración usada para referirse a los restos de las proteínas v.2 y v.3 de fHBP difieren de la numeración basada en las secuencias de aminoácidos reales de dichas proteínas. Así pues, por ejemplo, la referencia a un resto de leucina (L) de la posición 166 de la secuencia de v.2 o la v.3 de fHBP de la Figura 3, se refiere al resto de la posición 165 de la proteína v.2 y de la posición 173 de la proteína v.3. Para una mayor aclaración, véase la Figura 4 de la alineación. En el presente documento, se proporcionan datos de los restos reactivos y no reactivos. El resto mostrado para el mAb 502 es de un estudio publicado previamente (Giuliani *et al.*, 2005 *Infect Immun* 73:1151-60). La numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de la v.1 de fHBP de MC58, que carece de la secuencia señal (Masignani *et al.*, 2003 *J Exp Med* 197: 789-99).

La Figura 4 es un esquema que proporciona una alineación de las secuencias de aminoácidos de fHBP de tipo silvestre y quimérica (la alineación se realizó usando ClustalW). Se muestran las secuencias de aminoácidos deducidas de la v.1 de fHBP de la cepa MC58 (abajo) y de la v.2 de cepa 8047 (arriba), junto con las dos secuencias quiméricas (en el medio, Quimera I y Quimera II). La numeración para las cuatro proteínas se basa en la proteína v.1 natural madura de MC58 (es decir, sin la secuencia señal). La proteína fHBP recombinante expresada en *E. coli* carece de la secuencia señal y siete restos presumiblemente flexibles (CSSGGGG). Se añadió una metionina N-terminal a cada secuencia mostrada para facilitar la expresión en *E. coli* (no mostrada). Se añadió una secuencia C-terminal LEHHHHHH a cada secuencia mostrada para facilitar el aislamiento (no mostrado). Las identidades de las quimeras con las respectivas secuencias de tipo silvestre se muestran con símbolos encima y debajo de la alineación (* = idénticas; : = conservadas; . = semiconservadas). La posición de la secuencia de aminoácidos de GEHT en los restos 136-139 de la parte C-terminal del dominio B de 8047 tras el punto de unión se indica en un recuadro. Los corchetes exteriores, que abarcan los restos 101 a 164, muestran la región de la proteína definida como el dominio B (Giuliani *et al.* "The region comprising amino acids 100 to 255 of *Neisseria meningitidis* lipoprotein GNA 1870 elicits bactericidal antibodies". *Infect Immun* 2005; 73:1151-60). Con una excepción, la Quimera I y la Quimera II tienen secuencias de aminoácidos idénticas. La excepción está en el resto 174, en el que la alanina de la Quimera I se ha reemplazado por lisina en la Quimera II. La posición de la sustitución A174K de la Quimera II se muestra en negrita. La alineación de secuencias se realizó con ClustalW.

La Figura 5 es una representación esquemática de fHBP quiméricas. La parte N-terminal del dominio B de la v.1 de fHBP está a la derecha, y la parte C-terminal del dominio B que abarca la hélice α de la proteína v.2 junto con el dominio C de la v. 2 de fHBP está a la izquierda. El punto de unión para estas quimeras, ilustrado por G136, se indica con una flecha y el texto acompañante. Ambas proteínas quiméricas expresan los epítomos de JAR 3 y JAR 5 expresados en el dominio B de la v.1 de fHBP, y el epítomo de JAR 10, que está en el dominio C de los subconjuntos de las cepas que expresan v.1, v.2 o v.3 de fHBP. La Quimera I contiene el epítomo de JAR 11, incluyendo el resto A174 (Grupo A), que se expresa en los dominios C de un subconjunto de las cepas que expresan la v.2 o v.3 de fHBP. La Quimera II contiene los epítomos JAR 32/JAR 35, incluyendo el resto K174, que se expresa en los dominios C de subconjuntos de cepas que expresan la v.2 o la v.3 de fHBP. Los dominios A no se muestran en estas representaciones. El modelo se construyó basándose en la estructura de RMN de Cantini *et al.* (2006) *J Biol Chem* 281:7220-7.

La Figura 6 proporciona los resultados del análisis SDS-PAGE de las fHBP purificadas de tipo silvestre y mutante.

Las proteínas se expresaron a partir de plásmidos basados en pET21 en BL21(DE3) de *E. coli* como fusiones de seis histidinas C-terminales y se purificaron mediante cromatografía de quelato metálico. Se sometieron las proteínas a diálisis frente a 1 x PBS, sacarosa al 5 % y DTT 1 mM, y se esterilizaron por filtración. Se separaron las proteínas (5 µg de cada) en un gel de poliacrilamida al 4-12 % y se tiñeron con azul de Coomassie. Carril 1, patrón de masa; 2, v.1 de fHBP (MC58); 3, v.2 de fHBP (8047); 4, Quimera I de fHBP; 5, Quimera II de fHBP.

La Figura 7 es un conjunto de gráficas que ilustran la unión de mAb anti-fHBP individuales a proteínas recombinantes. El grupo A muestra mAb preparados contra la v.1 de fHBP; Grupo B, v.2 de fHBP; Grupo C, v.3 de fHBP. Los símbolos representan diferentes antígenos en la placa: cuadrados vacíos, v.1 de fHBP; círculos vacíos, v.2 de fHBP; triángulos vacíos, Quimera I; asteriscos, Quimera II.

La Figura 8A proporciona una tabla de las cepas usadas en los ejemplos, incluyendo las usadas para medir las respuestas de los anticuerpos bactericidas en suero y la descripción de la identidad de las secuencias de aminoácidos en comparación con el prototipo v.1, v.2 y v.3 de fHBP, y la unión a los mAb JAR de las respectivas fHBP.

La Figura 8B muestra las identidades de aminoácidos de diferentes dominios de fHBP. Se realizan comparaciones para el dominio A (restos 1-100), el dominio B (restos 101-164) y el dominio C (restos 165-255). También se realizan comparaciones para el dominio B hasta el punto de unión (101 a 135) y el dominio B comenzando en el punto de unión (136-164). La numeración de restos de aminoácidos se basa en la proteína madura (es decir, la que carece de la secuencia señal) de la cepa MC58.

La Figura 9 es una gráfica que ilustra las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero de ratones inmunizados con proteínas recombinantes quiméricas administradas con adyuvante de Freund medidas frente a cepas de *N. meningitidis* del grupo B que expresan fHBP en el grupo v.1 antigénico. La cepa H44/76 expresa v.1 de fHBP idéntica a la de la vacuna de control de v.1 de fHBP. El resto de cepas expresa subvariantes de v.1 de fHBP (véase la tabla de la Figura 8A, anterior). Los valores se presentan como 1/GMT (título medio geométrico recíproco (o inverso)) con un intervalo de confianza del 95 %.

La Figura 10 es una gráfica que ilustra las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero de ratones inmunizados con proteínas recombinantes quiméricas administradas con adyuvante de Freund medidas frente al grupo B de *N. meningitidis* que expresa fHBP en los grupos antigénicos v.2 o v.3. La cepa 8047 expresa v.2 de fHBP idéntica a la de la vacuna de control de v.2 de fHBP. El resto de las cepas expresa subvariantes de v.2 o v.3 de fHBP (véase la tabla de la Figura 8A). Los valores se presentan como 1/GMT con un intervalo de confianza del 95 %. Los datos se estratifican basándose en las cepas que reaccionan con JAR 11 (grupo izquierdo) o JAR 32 (grupo derecho). Las vacunas de Quimera I y II son idénticas excepto que la Quimera I tiene el resto A174 y es positiva en JAR 11 y negativa en JAR 32, mientras que la Quimera II tiene el resto K174, y es negativa en JAR 11 y positiva en JAR 32. Véase la figura para los símbolos de barras.

La Figura 11 es una gráfica que ilustra las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero de ratones inmunizados con proteínas recombinantes quiméricas adsorbidas en hidróxido de aluminio medidas frente a cepas de *N. meningitidis* del grupo B que expresan fHBP en el grupo v.1 antigénico. La cepa H44/76 expresa v.1 de fHBP idéntica a la de la vacuna de control de v.1 de fHBP. El resto de las cepas expresa subvariantes de v.1 de fHBP. Los valores se presentan como 1/GMT (es decir, título medio geométrico recíproco (o inverso)) con un intervalo de confianza del 95 %. Los símbolos de barras para cada vacuna son como los mostrados en la Figura 10.

La Figura 12 es una gráfica que ilustra las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero de ratones inmunizados con proteínas recombinantes quiméricas adsorbidas en hidróxido de aluminio medidas frente al grupo B de *N. meningitidis* que expresa fHBP en los grupos antigénicos v.2 o v.3. La cepa 8047 expresa subvariantes de v.2 o v.3 de fHBP (véase la tabla de la Figura 8). Los valores se presentan como 1/GMT con un intervalo de confianza del 95 %. Los datos se estratifican basándose en las cepas que reaccionan con JAR 11 (grupo izquierdo) o JAR 32 (grupo derecho). Las vacunas de Quimera I y II son idénticas excepto que la Quimera I es positiva en JAR 11 y negativa en JAR 32, mientras que la Quimera II es negativa en JAR 11 y positiva en JAR 32. Los símbolos de barras para cada vacuna son como los mostrados en la Figura 10.

La Figura 13 es un esquema que muestra la alineación de secuencias de aminoácidos de v.1 de fHBP con polimorfismos naturales en la parte N-terminal del dominio B. En la nomenclatura alternativa basada en datos estructurales tridimensionales de toda la molécula de fHBP, la secuencia mostrada también comprende una parte C-terminal del dominio fHbpN y una pequeña parte N-terminal del dominio fHbpC como se indica encima de la alineación. La conservación de las secuencias se muestra debajo de la alineación (código como en la Figura 4). Las posiciones de las hélices α se muestran encima de la alineación. La posición del punto de unión de las proteínas quiméricas se muestra en el recuadro. La numeración se basa en la proteína madura (es decir, la que carece de la secuencia señal) de la cepa MC58. Las cepas MC48, M4105, 4243, NZ98/254 son positivos en reactividad hacia JAR3/JAR5; las cepas M6190 y 03S-0408 son negativos en la reactividad hacia JAR 3/5, y las cepas NM452 y CDC1573 no se han ensayado. Los restos G121 y K122, que se asocian con los epítomos de mAb JAR 3 y JAR 5, se muestran en negrita y texto subrayado. Cabe señalar que aunque la cepa 03S-0408 tiene G121, es negativo en

- 5 reactividad hacia JAR 3/5. Esta cepa tiene diferencias en tres aminoácidos entre las posiciones 101 y 146 en comparación con los aminoácidos de MC58: L109, V114 y S122. Dado que tanto L109 como V114 están presentes en secuencias reactivas, por ejemplo, 4243 y M4105, la falta de reactividad de 03S-0408 se puede atribuir a la presencia de serina en la posición 122 en lugar de lisina y, por lo tanto, además de G121, K122 también se asocia con la reactividad hacia JAR3/5.
- 10 La Figura 14 es una representación esquemática de la alineación de secuencias de aminoácidos de v.2 de fHBP con polimorfismos naturales en la parte carboxilo-terminal del dominio B y del dominio C, o como alternativa, en todo el dominio fHbpC basándose en la nomenclatura estructural tridimensional. La conservación de las secuencias se muestra debajo de la alineación (código como el de la leyenda de la Figura 4). Los restos implicados en epítomos de mAb anti-fHBP se designan con el número del mAb JAR encima de la alineación: JAR 11 (alanina en la posición del resto 174; A174); JAR 10 (lisina en la posición del resto 180 y glutamato en la posición 192; K180 y E192); JAR 13 (resto de serina en la posición 216; S216). La numeración en esta figura se basa en fHBP de la cepa MC58.
- 15 La Figura 15 es un esquema que ilustra vacunas quiméricas ilustrativas adicionales (Quimeras IIb, III, IV y V). La Quimera IIb se puede crear mediante la introducción de la sustitución K180R en la Quimera II. Las Quimeras III y V se pueden crear usando partes de los dominios A y B de la cepa NZ98/254 (subvariante v.1) con la parte distal del dominio B y del dominio C de la cepa de v.2 8047 (Quimera III) o de la cepa RM1090 de la subvariante v.2 (Quimera V). La Quimera IV usa los dominios A y B proximales del MC58 con los dominios B y C distales de la RM1090.
- 20 La Figura 16 es un esquema que muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de fHBP quiméricas ilustrativas adicionales (Quimera III, IV y V) de la región de la posición de cruce, que está indicada por el recuadro (restos GEHT). Los restos G121 y K122, implicados en los epítomos de JAR3 y JAR5, se muestran en negrita y subrayados.
- 25 La Figura 17 proporciona una tabla que resume la reactividad cruzada de los diferentes mAb JAR, sus respectivos isotipos de Ig y la capacidad de inhibir la unión de fH humano.
- 30 La Figura 18 es una tabla en la que figura la actividad bactericida mediada por complemento humana de cada uno de los mAb JAR cuando se ensayan individualmente o en combinación con un segundo mAb anti-fHBP.
- 35 La Figura 19 es una serie de gráficas que muestran la capacidad de los mAb JAR representativos preparados contra proteínas v.2 o v.3 fHBP para dar la inhibición dependiente de la concentración de la unión de fH a rFhBP en un ELISA. Grupo A, Inhibición de la unión de fH a v.2 de rFhBP. Grupo B, Inhibición de la unión de fH a v.3 de rFhBP. Las respectivas proteínas recombinantes v.2 y v.3 son las codificadas por los genes de fHBP de las cepas 8047 y M1239. Grupo C, Inhibición de la unión de fH a v.1 de rFhBP.
- 40 La Figura 20 es una tabla que enumera ciertas propiedades de los respectivos pares de mAb JAR con o sin anticuerpo bactericida mediado por complemento sinérgico, incluyendo las posiciones de restos de aminoácidos que participan en los epítomos, las distancias entre los mismos, la inhibición de la unión a fH y el isotipo de cada mAb.
- 45 La Figura 21 proporciona la secuencia de aminoácidos de la variante 1 (v.1) de la proteína de unión al factor H (fHBP) de MC58, con los dominios A, B y C indicados. También se muestran las posiciones de los dominios estructurales fHbpN y fHbpC. Glutamina 101 (Q) y glicina 164 (G) indicados con flechas hacia arriba definen los límites de los dominios el A/B y B/C, respectivamente, según lo definido por Giuliani *et al.*, *Infect. Immun.*, 2005, 73:1151-60. La flecha hacia arriba de la glicina 136 designa el límite entre los dominios fHbpN y fHbpC, según lo definido por Cantini *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2.009.
- 50 La Figura 22 muestra las partes amino (N)-terminal y carboxilo (C)-terminal de los dominios B y C, que se definen con respecto a la secuencia de aminoácidos conservada de GEHT. Las secuencias de aminoácidos que pueden definir un epítomo de JAR 3/5 están situadas N-terminalmente con respecto a la segunda hélice α ; las secuencias de aminoácidos que pueden definir un epítomo de JAR 11/32/35 están situadas C-terminalmente con respecto a la segunda hélice α . Se indica la hélice α (AH) 2.
- 55 La Figura 23 es un esquema que muestra las secuencias proteica y de nucleótidos de la Quimera I (MC58/8047). La secuencia antes del punto de unión (cruce) se muestra en minúsculas y la secuencia detrás del punto de unión se muestra en mayúsculas. Se muestran líneas de cincuenta restos. Solo se muestran las secuencias de *Neisseria*; las construcciones de expresión de *E. coli* contenían un marcador de metionina N-terminal y hexa-histidina C-terminal (LEHHHHHH).
- 60 La Figura 24 es un esquema que muestra las secuencias proteica y de nucleótidos de la Quimera II (MC58/8047). La secuencia antes del punto de unión (cruce) se muestra en minúsculas y la secuencia detrás del punto de unión se muestra en mayúsculas. Se muestran líneas de cincuenta restos. Solo se muestran las secuencias de *Neisseria*; las construcciones de expresión de *E. coli* contenían un marcador de metionina N-terminal y hexa-histidina C-terminal (LEHHHHHH). La sustitución A174K se muestra en negrita y subrayada.
- 65

La Figura 25 es un esquema que muestra las secuencias proteica y de nucleótidos de la Quimera IIb (MC58/8047 A174K/K180R). La secuencia antes del punto de unión (cruce) se muestra en minúsculas y la secuencia detrás del punto de unión se muestra en mayúsculas. Se muestran líneas de cincuenta restos. Solo se muestran las secuencias de *Neisseria*; las construcciones de expresión de *E. coli* contenían un marcador de metionina N-terminal y hexa-histidina C-terminal (LEHHHHHH). Las sustituciones A174K y K180R se muestran en negraita.

La Figura 26 es un esquema que muestra las secuencias proteica y de nucleótidos de la Quimera III (NZ98254/8047). La secuencia antes del punto de unión (cruce) se muestra en minúsculas y la secuencia detrás del punto de unión se muestra en mayúsculas. Se muestran líneas de cincuenta restos. Solo se muestran las secuencias de *Neisseria*; las construcciones de expresión de *E. coli* contenían un marcador de metionina N-terminal y hexa-histidina C-terminal (LEHHHHHH).

La Figura 27 es un esquema que muestra las secuencias proteica y de nucleótidos de la Quimera IV (MC58/RM1090). La secuencia antes del punto de unión (cruce) se muestra en minúsculas y la secuencia detrás del punto de unión se muestra en mayúsculas. Se muestran líneas de cincuenta restos. Solo se muestran las secuencias de *Neisseria*; las construcciones de expresión de *E. coli* contenían un marcador de metionina N-terminal y hexa-histidina C-terminal (LEHHHHHH).

La Figura 28 es un esquema que muestra las secuencias proteica y de nucleótidos de la Quimera V (NZ98254/RM1090). La secuencia antes del punto de unión (cruce) se muestra en minúsculas y la secuencia detrás del punto de unión se muestra en mayúsculas. Se muestran líneas de cincuenta restos. Solo se muestran las secuencias de *Neisseria*; las construcciones de expresión de *E. coli* contenían un marcador de metionina N-terminal y hexa-histidina C-terminal (LEHHHHHH).

La Figura 29 proporciona una tabla que muestra las posiciones de los restos asociados con la unión a mAb JAR. El resto reactivo de fHBP era de la cepa usada como fuente para la inmunización. Para los mAb anti-v.2, la cepa reactiva es 8047, cuya secuencia de fHBP es un 99,6 % idéntica a la de la cepa 2996. El resto no reactivo es el presente en la cepa no reactiva. La pérdida de reactividad asociada con un cambio del resto reactivo en no reactivo se indica como anulado (KO) y el cambio inverso se indica como activado (KI).

La Figura 30 proporciona una imagen de una transferencia Western que indica los restos que participan en los epítomos de JAR 10 y JAR 33. Se analizaron lisados de *E. coli* que contenían plásmidos que expresaban las respectivas fHBP de tipo silvestre y mutantes mediante transferencia Western con JAR 10 (Grupo A), mAb Penta-His (Grupo B) o JAR 33 (Grupo C).

La Figura 31 proporciona una imagen de una transferencia Western que indica un resto que participa en los epítomos de JAR 11, JAR 32 y JAR 35. Se analizaron lisados de *E. coli* que contenían plásmidos que expresaban las respectivas fHBP de tipo silvestre y mutantes mediante transferencia Western con JAR 32 (Grupo A), JAR 35 (Grupo B), JAR 11 (Grupo C) o mAb Penta-His (Grupo D).

La Figura 32 proporciona una imagen de una transferencia Western que indica un resto que participa en el epítomo de JAR 13. Lisados de *E. coli* que contenían plásmidos que expresaban las respectivas fHBP de tipo silvestre y mutantes: carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, pET21 (plásmido vacío); carril 3, fHBP (8047) wt; carril 4, fHBP (8047) S216G; carril 5, fHBP (RM1090) wt; carril 6, fHBP (RM1090) G216S. Las transferencias se sondaron con JAR 13 (Grupo A) o mAb Penta-His (Grupo B) y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-HRP.

La Figura 33 proporciona una imagen de una transferencia Western de fHBP de tipo silvestre (WT) o química expresada en *N. meningitidis*. Carril 1, fHBP H44/76 KO transformada con plásmido PCOM-fHBP v.2 de tipo silvestre; 2, fHBP H44/76 KO transformada con plásmido pCom-Quimera I; 3, marcador Kaleidoscope; 4, marcador Magic Mark; 5, células H44/76 (v.1) de tipo silvestre; 6, células 8047 (v.2) de tipo silvestre; 7, células de fHBP 8047 KO; 8, proteína v.1 de fHBP recombinante (r) (gen de la cepa MC58); 9, proteína v.2 de fHBP (gen de la cepa 8047). Grupo superior, transferencia sondada con mAb anti-fHBP JAR 3 (v.1); grupo inferior, transferencia sondada con mAb anti-fHBP JAR 13 (v.2 o v.3).

La Figura 34 muestra diagramas de bandas de v.1 de fHBP de longitud completa. Grupo A, fHBP se divide en tres dominios indicados por varios tonos de gris. El dominio A y la parte N-terminal del dominio B están a la izquierda, y el límite entre los dominios A y B se indica mediante una flecha en la lisina 100. La parte C-terminal del dominio B junto con el dominio C está a la derecha, donde el límite entre los dos se designa con una flecha en la glicina 164. Grupo B, una nomenclatura alternativa describe la fHBP como aquella que tiene dos dominios estructurales. El dominio N-terminal que contiene una mezcla de hélices α y cadenas β se denomina dominio fHbpN (izquierda), y el dominio C-terminal que consiste en cadenas β se marca como el dominio fHbpC (derecha). fHbpN y fHbpC están conectados por un enlazador en o próximo a la glicina 136. En algunas realizaciones, el punto de unión correspondiente para la fHBP química descrita en el presente documento está en o próxima a G136, indicado por una flecha en ambos grupos. Los modelos mostrados en ambos grupos se construyen basados en la estructura de RMN de Cantini *et al.*, *J Biol Chem* 2009.

Antes de describir la presente invención y las realizaciones ilustrativas específicas de la invención, se ha de entender que la presente invención no se limita a las realizaciones descritas en particular, ya que, como es evidente, puede variar. También se ha de entender que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará únicamente limitado por las reivindicaciones anexas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que se incluye en la invención cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre el límite superior o inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido. También se incluyen en la invención los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños que pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluya uno o ambos límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyan cualquiera de ambos de estos límites incluidos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque, en la práctica o el ensayo de la presente invención, también se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen los métodos y los materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento son para desvelar y describir los métodos y/o los materiales en relación con los que se citan en las publicaciones.

Cabe señalar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular de "un", "una", y "el" y "ella" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así pues, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una pluralidad de dichos antígenos, y la referencia a "la proteína" incluye la referencia a una o más proteínas, etcétera.

Las publicaciones mencionadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento se debe interpretar como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas de la invención

La presente divulgación proporciona fHBP quiméricas que pueden generar anticuerpos que son bactericidas para diferentes cepas de variantes de fHBP de *N. meningitidis*, y métodos de uso.

Definiciones

"Proteína de unión al factor H" (fHBP), que también se conoce en la literatura como GNA1870, GNA 1870, ORF2086, LP2086 (lipoproteína 2086) y "741" se refiere a un polipéptido de *N. meningitidis* que es una lipoproteína presentada en la superficie de la bacteria. Las cepas de *N. meningitidis* se han subdividido en tres grupos de variantes de fHBP (denominadas variante 1 (v.1), variante 2 (v.2) y variante 3 (v.3) en algunos informes (Masignani *et al.*, 2003, *supra*) y la familia A y B en otros informes (véase, por ejemplo, Fletcher *et al.*, 2004 *Infect Immun* 2088-2100)) basándose en la variabilidad y la reactividad inmunológica cruzada de las secuencias de aminoácidos (Masignani *et al.*, *J Exp Med* 2003; 197:789-99). Para mayor claridad, la presente divulgación usa la terminología v.1, v.2 y v.3. Dado que la longitud de la proteína variante 2 (v.2) de fHBP (de la cepa 8047) y la variante 3 (v.3) de fHBP (de la cepa M1239) difieren en -1 y +7 restos de aminoácidos, respectivamente, de la de MC58, la numeración usada para referirse a los restos para las proteínas v.2 y v.3 de fHBP difiere de la numeración basada en las secuencias de aminoácidos reales de estas proteínas. Así pues, por ejemplo, la referencia a un resto de leucina (L) en la posición 166 de la secuencia de v.2 o v.3 de fHBP de la Figura 3 se refiere al resto de la posición 165 de la proteína v.2 y de la posición 173 de la proteína v.3. Para mayor claridad, véase la Figura 4 para la alineación.

El término "heterólogo" se refiere a dos componentes que están definidos por estructuras derivadas de diferentes fuentes. Por ejemplo, cuando se usa "heterólogo" en el contexto de un polipéptido quimérico, el polipéptido quimérico incluye secuencias de aminoácidos unidas operativamente que se pueden derivar de diferentes polipéptidos (por ejemplo, un primer componente de un polipéptido v.1 de fHBP y un segundo componente de un polipéptido v.2 de fHBP). De igual manera, "heterólogo", en el contexto de un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico, incluye una secuencia de ácido nucleico unida operativamente que se puede derivar de diferentes genes (por ejemplo, un primer componente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido v.1 de fHBP y un segundo componente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido v.2 de fHBP). Dichos polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento proporcionan la presentación de epítopos en un solo polipéptido que normalmente se encuentran en diferentes polipéptidos. Otros ácidos nucleicos "heterólogos" ilustrativos incluyen construcciones de expresión en las que un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante está unida operativamente a un elemento regulador (por ejemplo, un promotor) que es de un origen genético diferente del de la secuencia de codificación (por ejemplo, para proporcionar la expresión en una célula hospedadora de interés que

puede ser de diferente origen genético que el del promotor, de la secuencia de codificación o ambos). Por ejemplo, un promotor T7 unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido fHBP o un dominio del mismo se dice que es un ácido nucleico heterólogo. "Heterólogo", en el contexto de las células recombinantes, puede referirse a la presencia de un ácido nucleico (o producto génico, tal como un polipéptido) que es de un origen genético diferente del de la célula hospedadora en la que se encuentra presente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos y de ácido nucleico de *Neisseria* de una cepa es heteróloga a un hospedador de *Neisseria* de otra cepa.

"Heterólogo", como se usa en el presente documento en el contexto de una fHBP quimérica (por ejemplo, "dominio heterólogo de fHBP", por ejemplo, un "dominio B heterólogo", "dominio C heterólogo") indica que la proteína fHBP quimérica contiene secuencias de aminoácidos contiguas y unidas operativamente de elementos estructurales de al menos dos variantes de fHBP diferentes (por ejemplo, para proporcionar la presentación de epítomos de una v.1 de fHBP, y la presentación de una v.2 de fHBP y/o una v.3 de fHBP en un solo polipéptido fHBP). Por ejemplo, un "dominio B heterólogo" se refiere a un polipéptido que comprende un dominio B que contiene una primera parte que tiene una secuencia de aminoácidos contigua de un dominio B de una primera variante de fHBP unida operativamente a una segunda parte que tiene una secuencia de aminoácidos contigua de un dominio B de una segunda variante de fHBP.

"Derivada de", en el contexto de una secuencia de aminoácidos o secuencia de polinucleótido (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos "derivada de" una v.1 de fHBP) pretende indicar que el polipéptido o el ácido nucleico tiene una secuencia que se basa en la de un polipéptido o ácido nucleico de referencia (por ejemplo, una proteína fHBP natural o ácido nucleico codificante), y no pretende limitarse a la fuente ni al método en el que se crea la proteína o el ácido nucleico. "Derivado de" en el contexto de las cepas bacterianas pretende indicar que una cepa se obtuvo a través del paso *in vivo*, o en cultivo *in vitro*, de una cepa parental y/o es una célula recombinante obtenida mediante la modificación de una cepa parental.

"Sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido con otro que comparte las propiedades químicas y físicas de la cadena lateral de aminoácidos (por ejemplo, carga, tamaño, hidrofobicidad/hidrofilidad). Las "sustituciones conservadoras" pretenden incluir la sustitución dentro de los siguientes grupos de restos de aminoácidos: Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos en el contexto de una fHBP quimérica desvelada en el presente documento se seleccionan para preservar la presentación de un epítomo de interés. Se puede obtener orientación para dichas sustituciones de las alineaciones de secuencias de aminoácidos de polipéptidos que presentan el epítomo de interés.

La expresión "inmunidad protectora" significa que un programa de vacunación o inmunización que se administra a un mamífero induce una respuesta inmunitaria que previene, retrasa el desarrollo de o reduce la gravedad de una enfermedad que es causada por *Neisseria meningitidis*, o disminuye o elimina por completo los síntomas de la enfermedad. La inmunidad protectora puede estar acompañada por la producción de anticuerpos bactericidas. Cabe señalar que la producción de anticuerpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* se acepta en el campo como predictiva de un efecto protector de la vacuna en seres humanos. (Goldschneider *et al.*, 1969, *J. Exp. Med.* 129:1307; Borrow *et al.*, 2001 *Infect Immun.* 69:1568).

La expresión "una enfermedad causada por una cepa del grupo B capsular de *Neisseria meningitidis*" incluye cualquier síntoma clínico o combinación de síntomas clínicos que están presentes en una infección en un ser humano con un miembro del grupo B capsular de *Neisseria meningitidis*. Dichos síntomas incluyen, pero sin limitación: la colonización del tracto respiratorio superior (por ejemplo, la mucosa de la nasofaringe y las amígdalas) por una cepa patógena del grupo B capsular de *Neisseria meningitidis*, la penetración de las bacterias en la mucosa y en el lecho vascular submucoso, septicemia, choque séptico, inflamación, lesiones cutáneas hemorrágicas, activación de la fibrinólisis y de la coagulación sanguínea, disfunción de órganos tales como riñón, pulmón e insuficiencia cardíaca, hemorragia suprarrenal e infarto muscular, filtración capilar, edema, isquemia periférica en extremidades, síndrome de distrés respiratorio, pericarditis y meningitis.

La expresión "inmunidad protectora de amplio espectro" significa que un programa de vacunación o inmunización provoca "inmunidad protectora" contra al menos más de una cepa (o puede ser contra al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, contra al menos ocho o más cepas) de *Neisseria meningitidis*, en la que cada una de las cepas expresa una subvariante de fHBP o variante de fHBP diferente. La presente divulgación contempla y engloba específicamente una vacuna o un régimen de vacunación que confiere protección contra una enfermedad causada por un miembro de cualquier grupo capsular (por ejemplo, A, B o C), con protección contra la enfermedad causada por una cepa del grupo B capsular de *Neisseria meningitidis* que es de interés debido a la prevalencia epidemiológica de las cepas causantes de la enfermedad con este grupo capsular y falta de vacunas del grupo B ampliamente eficaces.

La expresión "se une específicamente a un anticuerpo" o "específicamente inmunorreactivo con", en el contexto de un antígeno (por ejemplo, un antígeno polipeptídico), se refiere a una reacción de unión que se basa en y/o demuestra la presencia del antígeno en una muestra que también puede incluir una población heterogénea de otras

moléculas. Por lo tanto, en las condiciones indicadas, el anticuerpo o los anticuerpos específico/s se une/n a uno o más antígenos en particular de una muestra y no se une/n, en una cantidad significativa, a otras moléculas presentes en la muestra. La expresión "se une específicamente a un anticuerpo" o "específicamente inmunorreactivo con", en el contexto de un epítipo de un antígeno (por ejemplo, un epítipo de un polipéptido), se refiere a una reacción de unión que se basa en y/o demuestra la presencia del epítipo de un antígeno (por ejemplo, un polipéptido) que también puede incluir una población heterogénea de otros epítopos, así como una población heterogénea de antígenos. Por lo tanto, en las condiciones indicadas, el anticuerpo o los anticuerpos específico/s se une/n a un determinado epítipo de un antígeno y no se unen en una cantidad significativa a otros epítopos presentes en el antígeno y/o en la muestra.

La expresión "en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria" significa que hay una diferencia detectable entre un indicador de respuesta inmunitaria medido antes y después de la administración de una preparación de antígeno particular. Los indicadores de respuesta inmunitaria incluyen, pero sin limitación: el título o la especificidad de los anticuerpos, detectados mediante un ensayo, tal como el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), un ensayo bactericida, citometría de flujo, inmunoprecipitación, inmunodifusión de Ouchter-Lowny; ensayos de detección de unión, por ejemplo, de manchas, de transferencia Western o de matrices de antígenos; ensayos de citotoxicidad, etc.

Un "antígeno de superficie" es un antígeno que está presente en una estructura de la superficie de *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, la membrana externa, la membrana interna, el espacio periplasmático, cápsula, pili, etc.).

"Aislado" se refiere a una entidad de interés que se encuentra en un ambiente diferente de aquel en el que el compuesto se puede encontrar de manera natural. "Aislado" pretende incluir los compuestos que están en las muestras que están sustancialmente enriquecidas en el compuesto de interés y/o en las que el compuesto de interés está parcial o sustancialmente purificado.

"Enriquecido/a" significa que una muestra se ha manipulado de manera artificial (por ejemplo, mediante un experimentador o un clínico) de modo que un compuesto de interés está presente a una concentración superior (por ejemplo, al menos tres veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 64 veces mayor, o superior) a la concentración del compuesto en la muestra de partida, tal como una muestra biológica (por ejemplo, una muestra en la que el compuesto se produce de forma natural o en la que está presente después de la administración), o en la que se creó el compuesto (por ejemplo, como en un polipéptido bacteriano, anticuerpo, polipéptido quimérico, y similares).

La "anulación" de un gen diana se refiere a una modificación de la secuencia del gen que da lugar a una disminución de la función del gen diana, por ejemplo, de manera que la expresión del gen diana sea indetectable o insignificante, y/o el producto génico no sea funcional o significativamente funcional. Por ejemplo, una "anulación" de un gen implicado en la síntesis de LPS indica que la función del gen se ha reducido sustancialmente de modo que la expresión del gen no es detectable o solo está presente a niveles insignificantes y/o una actividad biológica del producto génico (por ejemplo, una actividad enzimática) se reduce significativamente con respecto a como era antes de la modificación o no es detectable. Las "anulaciones" engloban anulaciones condicionales, en las que se puede producir la modificación del gen diana, por ejemplo, tras la exposición a un conjunto predefinido de condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolaridad, exposición a la sustancia que potencia la alteración del gen diana, y similares). Una "activación" de un gen diana se refiere a una modificación genética del genoma de una célula hospedadora que da lugar a un aumento de una función proporcionada por el gen diana.

fHBP Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN LA fHBP

Antes de describir fHBP quiméricas ilustrativas adicionales contempladas por la presente divulgación, es útil describir las fHBP de origen natural a partir de las que se pueden derivar las fHBP quiméricas.

Por comodidad y con el fin de aclarar, la secuencia de aminoácidos natural de la v.1 de fHBP de la cepa MC58 de *N. meningitidis* se selecciona arbitrariamente como una secuencia de referencia para todas las secuencias de aminoácidos de v.1, v.2 y v.3 de fHBP natural, así como para las fHBP quiméricas descritas en el presente documento. Se han adoptado dos sistemas de nomenclatura para describir las fHBP: uno, que, por comodidad divide la proteína en tres dominios, designados A, B y C (Giuliani *et al.*, *Infect Immun* 2005; 73:1151-60), y el otro basado en datos estructurales tridimensionales. En el sistema de nomenclatura alternativo que describe las fHBP basándose en datos estructurales tridimensionales, la fHBP se divide en dos dominios: la fHBPn y la fHbpC. A continuación, se describen los detalles de cada uno de estos dominios con referencia a la secuencia de aminoácidos de v.1 de fHBP de la cepa MC58.

Dominios A, B y C usando la primera definición.

Como se ha indicado anteriormente, la nomenclatura basada en tres dominios describe la fHBP como aquella que tiene un "dominio A", un "dominio B" y un "dominio C". En la Fig. 21, se muestra la secuencia de aminoácidos de la v.1 de fHBP de la cepa MC58 junto con los límites de los dominios A, B y C. Los restos Q101 y G164 indicados por

las flechas hacia arriba denotan los límites de los dominios A/B y B/C, respectivamente. Los símbolos "α" indican la posición de la primera y segunda hélice α de la fHBP (denominadas AH1 y AH2). Los restos GEHT están subrayados seguidos por la segunda hélice α (AH2) de fHBP. El Grupo A de la Fig. 34 también muestra un diagrama de bandas de la fHBP de longitud completa con los dominios A, B, y C indicados en varios tonos de gris.

5 La Fig. 3 proporciona un esquema de un modelo estructural truncado de fHBP que tiene los dominios B y C unidos operativamente (el dominio A y una parte de la parte de N-terminal del dominio B no se muestran). La v.1 de fHBP natural de MC58 se volvió a usar como una secuencia de referencia para numerar los restos. Se observan los restos de aminoácidos identificados por mutagénesis dirigida de fHBP que contribuyen a la unión de los nueve mAAb anti-fHBP (denominados mAAb "Jar"). Para construir el modelo, se usaron coordinados de la estructura en solución de los dominios B y C de fHBP de la cepa MC58. Se ilustra la hélice α del dominio B, al igual que los bucles y las cadenas β del dominio C.

Dominios estructurales tridimensionales/fHbpN y fHbpC

15 En un sistema de nomenclatura alternativa, fHBP se describe con dos dominios estructurales en comparación con los tres dominios descritos anteriormente. El sistema de nomenclatura de dos dominios se basa en información estructural de una de fHBP de longitud completa a partir de la cual se pueden construir modelos tridimensionales tales como los que se muestran en la Fig. 34. La modelización estructural revela que fHBP de longitud completa se encuentra en solución como dos dominios separados conectados por un enlazador. En la Fig. 21, se muestra la secuencia de aminoácidos de la v.1 de fHBP de la cepa MC58 con el extremo del dominio fHbpN indicado con una flecha en glicina 136. El dominio N-terminal se denomina fHbpN (restos 8-136) y el dominio C-terminal se denomina fHbpC (restos 141-255), comprendiendo cada uno al menos 8 cadenas P antiparalelas y unido por un enlazador natural (restos 137-140). Como se observa en la Fig. 21, el enlazador también comprende hélice α AH2, pues "α" debajo de la secuencia en la Fig. 21 marca las posiciones de las hélices α que residen en fHBP. Con el fin de simplificar, en el presente documento, se considera que el dominio fHbpC incluye el enlazador que conecta los dominios N-terminal y C-terminal basados en la convención de dicha nomenclatura.

30 La fHBP se ha dividido en tres grupos de variantes (denominadas variante 1 (v.1), variante 2 (v.2) y variante 3 (v.3)), basándose en la variabilidad y la reactividad inmunológica cruzada de las secuencias de aminoácidos (Massignani *et al.*, 2003, *J Exp Med* 197:789-99). En ciertos estudios, fHBP también se ha subdividido en dos subfamilias designadas subfamilia A (que incluye la v.2 y la v.3 de Massignani *et al.*, 2003, *J Exp Med* 197:789-99) y la subfamilia B (v.1) (Fletcher *et al.*, 2004, *Infect Immun.* 72: 2088-100). "Variante" como se usa en el contexto de una "variante de fHBP" se refiere a una fHBP que comparte al menos un 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la cepa prototipo de ese grupo de variantes (cepa MC58 para v.1; cepa 2996 para v.2; y cepa M1239 para v.3). Éstas eran las secuencias prototipo originales descritas por Massignani *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2003. Las cepas de un grupo de variantes codifican fHBP con identidad de aminoácidos superior al 88 %, mientras que las cepas de diferentes grupos de variantes de fHBP son del aproximadamente 60 al 88 % idénticas. Las fHBP del mismo grupo de "variantes" poseen más del 88 % de identidad con la respectiva secuencia prototipo (v.1, cepa MC58, v.2, cepa 2996; v.3, cepa M1239). Una "subvariante" como se usa en el contexto de una "subvariante de fHBP" se refiere a polipéptidos fHBP que difieren de la secuencia prototipo. Por ejemplo, la cepa NZ98/254 se conoce como una subvariante de v.1 de fHBP, con un 91 % de identidad con la secuencia prototipo de la cepa MC58; la cepa RM1090 se conoce como una subvariante de v.2 de fHBP, con una secuencia que es un 94 % idéntica a la cepa prototipo v.2 2996. Los ejemplos de subvariantes, y sus identidades de secuencias de aminoácidos relativas, se proporcionan en las Figuras 8A y 8B.

50 Los polipéptidos fHBP, y ácidos nucleicos codificantes, de la que partes de las fHBP quiméricas de la presente divulgación pueden derivarse pueden ser de cualquier cepa de *N. meningitidis* adecuada. Como es conocido en la técnica, las cepas de *N. meningitidis* se dividen en grupos serológicos (grupos capsulares), serotipos (fenotipos PorB) y subtipos (fenotipos PorA) basándose en las reacciones con anticuerpos policlonales (Frasch, C. E. y Chapman, 1973, *J. Infect. Dis.* 127:149-154) o monoclonales que interactúan con diferentes antígenos de superficie. La agrupación capsular tradicionalmente se ha basado en las variaciones inmunológicamente detectables del polisacárido capsular, pero se están reemplazando por PCR de genes que codifican enzimas específicas responsables de la biosíntesis de los polisacáridos capsulares estructuralmente diferentes. Se conocen aproximadamente 12 grupos capsulares (incluyendo A, B, C, X, Y, Z, 29-E y W-135). Las cepas de los grupos capsulares A, B, C, Y y W-135 representan casi toda la enfermedad meningocócica. Tradicionalmente, la serotipificación se ha basado en las diferencias antigénicas definidas por los anticuerpos monoclonales en una proteína de membrana externa denominada Porina B (PorB). Actualmente, se conocen anticuerpos que definen aproximadamente 21 serotipos (Sacchi *et al.*, 1998, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5:348). La subserotipificación se ha basado en variaciones antigénicas definidas por anticuerpos en una proteína de membrana denominada Porina A (PorA). Tanto la serotipificación como la subserotipificación se están reemplazando por la PCR y/o la secuenciación del DNA para la identificación de genes que codifican las regiones variables de PorB y PorA, respectivamente que están asociadas con reactividad de los mAAb (por ejemplo, Sacchi, Lemos *et al.*, *supra*; Urwin *et al.*, 1998, *Epidem. and Infect.* 120: 257).

65

N. meningitidis también se puede dividir en grupos o subgrupos clonales, usando diversas técnicas que caracterizan directa o indirectamente el genoma bacteriano. Estas técnicas incluyen la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), basada en la variación de la movilidad electroforética de una enzima, que refleja los polimorfismos subyacentes a un determinado locus genético. Mediante la caracterización de las variantes de una serie de dichas proteínas, se puede deducir la "distancia" genética entre dos cepas a partir de la proporción de desapareamientos. De igual manera, se puede deducir la clonalidad entre dos aislamientos si los dos tienen patrones idénticos de variantes electroforéticas en el número de loci. En la literatura más reciente, la tipificación de secuencias multilocus (MLST) ha reemplazado a la MLEE como método de elección para la caracterización de microorganismos. Usando la MLST, se deduce la distancia genética entre dos aislados, o la clonalidad, a partir de la proporción de desapareamientos de las secuencias de ADN de siete genes constitutivos de cepas de *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95: 3140).

Si bien se pueden usar cepas de *N. meningitidis* de cualquier grupo capsular, las cepas de *N. meningitidis* del grupo capsular B son de particular interés como fuentes a partir de las que se deriva el ácido nucleico que codifica la fHBP y sus dominios.

Aunque la memoria descriptiva proporciona la secuencia de aminoácidos de las fHBP ilustrativas de las que el se puede derivar la fHBP quimérica, esto no pretende ser limitante. Por ejemplo, la fHBP quimérica puede contener secuencias de aminoácidos que sean al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idénticas a una secuencia de aminoácidos de una fHBP natural.

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos fHBP para su uso en la construcción de las fHBP quiméricas contempladas en el presente documento son conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el documento WO 2004/048404; Masignani *et al.* 2003 *J Exp Med* 197:789-799; Fletcher *et al. Infect Immun* 2004 2088-2100; Welsch *et al. J Immunol* 2004 172:5606-5615; y el documento WO 99/57280, se describen polipéptidos fHBP ilustrativos. El ácido nucleico (y secuencias de aminoácidos) para las variantes y subvariantes fHBP también se proporcionan en el GenBank como n.º de acceso: NC_003112, GenelD: 904318 (NCBI Ref. NP_274866) (de la cepa de *N. meningitidis* MC58); AY548371 (AAT01290.1) (la cepa de *N. meningitidis* CU385); AY548370 (AAT01289.1) (la cepa de *N. meningitidis* H44/76); AY548377 (AAS56920.1) (la cepa de *N. meningitidis* M4105); AY548376 (AAS56919.1) (la cepa de *N. meningitidis* M1390); AY548375 (AAS56918.1) (la cepa de *N. meningitidis* N98/254); AY548374 (AAS56917.1) (la cepa de *N. meningitidis* M6190); AY548373 (AAS56916.1) (la cepa de *N. meningitidis* 4243); y AY548372 (AAS56915.1) (la cepa de *N. meningitidis* BZ83).

Para identificar las secuencias de aminoácidos correspondientes contempladas para su uso en las fHBP quiméricas desveladas en el presente documento, cabe señalar que la proteína fHBP inmadura incluye una secuencia líder de aproximadamente 19 restos. Además, cuando se proporciona una secuencia de aminoácidos, el experto habitual en la materia puede imaginar fácilmente las secuencias de ácido nucleico que pueden codificar, y proporcionar la expresión de, un polipéptido que tenga dicha secuencia de aminoácidos.

Además de las secuencias de aminoácidos y las secuencias de ácido nucleico específicas proporcionadas en el presente documento, la divulgación también contempla polipéptidos y ácidos nucleicos que tienen secuencias que son al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idénticas en secuencia a dicho aminoácido y ácidos nucleicos ilustrativos. Los términos "idénticas" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de polinucleótidos, o dos o más secuencias de aminoácidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idénticas en una región especificada), cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima en una región designada, por ejemplo, un dominio B o una parte del mismo, por ejemplo, una región de al menos aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o más aminoácidos o nucleótidos de longitud, y pueden ser de hasta la longitud completa de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de referencia (por ejemplo, una fHBP de longitud completa). La divulgación contempla específicamente tanto polimorfismos de origen natural como secuencias de aminoácidos producidas sintéticamente y sus ácidos nucleicos codificantes.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de polipéptido fHBP natural), con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un programa informático, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad entre las secuencias para la/s secuencia/s de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de las secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y Altschul *et al.* (1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, respectivamente. El programa informático para realizar el análisis BLAST se encuentra a disposición del público en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov). Otros algoritmos ilustrativos incluyen ClustalW (Higgins D., *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680),

disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html.

En una realización, las posiciones de restos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la capacidad de intercambio de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es el de glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es el de serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es el de fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es el de lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es el de cisteína y metionina.

La identidad de secuencia entre dos ácidos nucleicos también se puede describir en términos de hibridación de dos moléculas entre sí en condiciones rigurosas. Las condiciones de hibridación se seleccionan siguiendo los métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación a 50 °C o temperatura superior y 0,1 x SSC (cloruro de sodio 15 mM/citrato de sodio 1,5 mM). Otro ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es la incubación durante la noche a 42 °C en una solución de: formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado, desnaturalizado, seguido del lavado de los filtros en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C. Las condiciones de hibridación rigurosas son condiciones de hibridación que son al menos tan rigurosas como las condiciones representativas anteriores, considerándose que las condiciones son al menos tan rigurosas si son al menos un 80 % tan rigurosas, por lo general, al menos un 90 % tan rigurosas como las condiciones rigurosas específicas anteriores.

A continuación, se describe la fHBP quimérica de la presente divulgación más detalladamente en el contexto tanto de la nomenclatura en la que la proteína se divide en tres dominios, usada por Giuliani *et al.* (*Infect Immun* 2005; 73: 1151-60) como de la nomenclatura estructural tridimensional.

30 **Dominio A de las fHBP**

Como se ha indicado anteriormente, para facilitar el análisis, la fHBP se puede describir como aquella que tiene los tres dominios siguientes: dominio A, dominio B y dominio C. Como se muestra en la Fig. 21, las flechas hacia arriba de Q101 y G164 demarcan los límites entre los dominios A/B y los dominios B/C, respectivamente. Las fHBP quiméricas de la presente divulgación incluyen opcionalmente un dominio A. Por conveniencia y claridad, el dominio A se puede definir estructuralmente como aquellos restos correspondientes a los restos 1-100 de v.1 de fHBP de MC58, donde la numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de v.1 de fHBP de MC58 que carece de la secuencia señal (Masignani *et al.*, 2003, *J Exp Med* 197:789-99) (véase la Figura 21). Como se ilustra en la alineación de v.1 de fHBP de MC58 y v.2 de fHBP de 8047, las respectivas secuencias de aminoácidos de los dominios A de las fHBP normalmente comparten una identidad de las secuencias de aminoácidos significativa (véase la Fig. 8B). Las fHBP quiméricas que contienen un dominio A pueden contener una secuencia de aminoácidos del dominio A contigua que sea al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de un dominio A de una fHBP natural. El dominio A puede derivarse del mismo grupo de variantes (y se puede derivar de la misma fHBP) que la parte N-terminal del dominio B, de modo que la secuencia de aminoácidos de la unión A/B sea una que se pueda encontrar en naturaleza. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos del dominio A se puede derivar de un grupo de variantes de fHBP diferente del grupo de variantes de fHBP del que se deriva la secuencia de aminoácidos N-terminal del dominio B (por ejemplo, el dominio A se puede derivar de una v.2 de fHBP y la secuencia de aminoácidos N-terminal del dominio B derivarse de una v.1 de fHBP).

50 **Dominio B de v.1 de fHBP**

Como se ha indicado anteriormente, las fHBP quiméricas de la presente divulgación contienen la secuencia de aminoácidos de un dominio B de v.1 de fHBP. Las secuencias de aminoácidos de v.1 de fHBP, que incluyen los dominios B de v.1 de fHBP, son bien conocidos en la técnica, y se pueden usar para derivar la secuencia de aminoácidos deseada de una fHBP desvelada en el presente documento. La Fig. 13 proporciona las secuencias de aminoácidos de una parte N-terminal del dominio B de las v.1 de fHBP seleccionadas. La alineación ilustra la posición y la identidad polimorfismos naturales entre las v.1 de fHBP. La Figura 8A ilustra la identidad de las secuencias de aminoácidos entre las fHBP de longitud completa de las cepas de v.1, v.2 y v.3 ilustrativas y, además, ilustra la presencia o ausencia de epítomos definidos por los mAb JAR indicados. La Figura 8B ilustra la identidad de las secuencias de aminoácidos entre los dominios A, B y C de las v.1, v.2 y v.3 de fHBP ilustrativas, así como la identidad de las secuencias de aminoácidos en las partes N-terminal (101-135) y C-terminal (136-164) de los dominios B.

La Fig. 21 muestra la secuencia de aminoácidos de la v.1 de fHBP de la cepa MC58, e ilustra la posición de un dominio B de longitud completa (definido por los restos 101-164 y que abarca la secuencia de aminoácidos de GEHT seguida por la hélice α AH2). La Fig. 22, Grupo A, ilustra que una parte N-terminal del dominio B de la v.1 de fHBP

de la cepa MC58 puede abarcar una secuencia de aminoácidos definida por los restos correspondientes a los restos N-terminales de los restos de GEHT y que se extienden hasta el extremo N del dominio B en un resto correspondiente al resto 101. La parte C-terminal del dominio B de la v.1 de fHBP de la cepa MC58 puede abarcar una secuencia de aminoácidos definida por los restos correspondientes a una secuencia de aminoácidos que se extiende N-terminalmente desde el resto 164 del dominio B, y que abarca hasta e incluyendo la secuencia de aminoácidos de GEHT. Por lo tanto, un dominio B de longitud completa está estructuralmente definido por los restos correspondientes a los restos 101-164 de la v.1 de fHBP de MC58, donde los restos 101-135 pueden definir una parte N-terminal ilustrativa del dominio B y los restos 136-164 pueden definir una parte C-terminal ilustrativa del dominio B, donde la numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de v.1 de fHBP de MC58, que carece de la secuencia señal (Masignani *et al*, 2003 *J Exp Med* 197:789-99).

Como se describirá a continuación con más detalle, cabe destacar que, en el contexto de las fHBP quiméricas de la presente divulgación que tienen un dominio B heterólogo, el extremo C de la parte N-terminal del dominio B (y, por lo tanto, el extremo N de la parte C-terminal del dominio B heterólogo) está definido por la posición del punto de unión, que puede estar presente N-terminal o C-extremo Con respecto a la secuencia de aminoácidos de GEHT, como se trata más adelante con mayor detalle. Por ejemplo, el punto de unión de un dominio B heterólogo de una fHBP quimérica se puede situar C-extremo Con respecto una secuencia correspondiente a la GEHT, y por lo tanto, se puede extender más allá de un resto correspondiente al resto 135.

Las fHBP quiméricas ilustrativas incluyen aquellas que comprenden un dominio B que tiene una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos del dominio B N-terminal de una v.1 de fHBP, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua de la secuencia de aminoácidos del dominio B N-terminal ilustrada en la Fig. 13. La fHBP quimérica ilustrativa que tiene un dominio B heterólogo contiene al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50 restos (y en algunas realizaciones, no más de 50 restos) de una secuencia de aminoácidos N-extremo Contigua de un dominio B de una v.1 de fHBP.

Dominios B y C de la v.2 de fHBP y de la v.3 de fHBP

Las fHBP quiméricas ilustrativas de la presente divulgación contienen un dominio B heterólogo que contiene una secuencia de aminoácidos N-terminal derivada de un parte N-terminal de un dominio B de la v.1 de fHBP y el resto de parte C-terminal derivada de la correspondiente parte C-terminal de un dominio B de la v.2 (o v.3) de fHBP, seguida de la secuencia de aminoácidos contigua de un dominio C de v.2 (o v.3). Por conveniencia y claridad, el dominio C se puede definir estructuralmente como aquellos restos correspondientes a los restos 165-255 de v.1 de fHBP de MC58, estando la numeración basada en la secuencia de aminoácidos de v.1 de fHBP de MC58, que carece de la secuencia señal (Masignani *et al.*, 2003, *J Exp Med*, 197:789-99) (véase la Figura 21).

Las secuencias de aminoácidos de la v.2 y la v.3 de fHBP, incluyendo los dominios B y C de v.2 y v.3 de fHBP, son bien conocidos en la técnica y se pueden usar para derivar la secuencia de aminoácidos deseada de una fHBP quimérica desvelada en el presente documento. La Fig. 14 proporciona las secuencias de aminoácidos de una parte C-terminal del dominio B (según lo ilustrado por los 25 aminoácidos C-terminales del dominio B de la v.2 de fHBP) y los dominios C de longitud completa de las v.2 de fHBP seleccionadas. La alineación ilustra la posición y la identidad de los polimorfismos naturales entre las v.2 de fHBP.

Las fHBP quiméricas ilustrativas incluyen las que comprenden un dominio B que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal derivada de un dominio B de v.2 o v.3, que normalmente tiene una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % o más idéntica a una secuencia de aminoácidos del dominio B C-terminal de una v.2 o v.3 de fHBP, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua de la secuencia de aminoácidos del dominio B C-terminal, tal como las secuencias de v.2 ilustradas en la Fig. 14. Cuando la fHBP quimérica contiene un dominio C heterólogo, el dominio B puede ser al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntico a una secuencia de aminoácidos contigua de una secuencia de aminoácidos del dominio B de longitud completa de una v.1 de fHBP. Un dominio B de longitud completa de una v.1 de fHBP es generalmente de aproximadamente 64 restos de longitud.

Dominio fHbpN de las fHBP

Como se ha tratado previamente, la fHBP también se puede describir como aquella que tiene dos dominios estructurales: fHbpN y fHbpC, basados en la nomenclatura alternativa que se deriva de la estructura de la fHBP de longitud completa. Como se muestra en la Fig. 21 y en el grupo B de la Figura 32, la glicina 136 marca aproximadamente el comienzo de un enlazador entre los dominios N-terminal y C-terminal, denominados fHbpN y fHbpC, respectivamente. La fHBP quimérica de la presente divulgación puede incluir un dominio fHbpN de longitud completa o un dominio fHbpN parcial. Por conveniencia y claridad, el dominio fHbpN se puede definir estructuralmente como aquellos restos correspondientes a los restos 1-136 de v.1 de fHBP de MC58, estando la numeración basada en la secuencia de aminoácidos de v.1 de fHBP de MC58 que carece de la secuencia señal

(Massignani *et al.*, 2003 *J Exp Med*, 197:789-99) (véase la Figura 21). Como se ilustra en la alineación de v.1 de fHBP de MC58 y v.2 de fHBP de 8047, las respectivas secuencias de aminoácidos de los 100 primeros restos del dominio fHbpN normalmente comparten una identidad de secuencia de aminoácidos significativa (Fig. 8B). La fHBP quimérica que contiene un dominio fHbpN puede contener una secuencia contigua de aminoácidos del dominio fHbpN que sea al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de un dominio fHbpN de una fHBP de origen natural.

Como alternativa, la fHBP quimérica puede incluir un dominio fHbpN parcial, de modo que una parte N-terminal de la fHBPN está truncada. El dominio fHbpN parcial puede comprender al menos 30, 40 o 50 de una secuencia de aminoácidos contigua C-terminal del dominio fHbpN de longitud completa.

Las fHBP quiméricas ilustrativas incluyen aquellas que comprenden un dominio fHbpN completo o parcial que tiene una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a al menos una parte C-terminal de la secuencia de aminoácidos de fHbpN de una v.1 de fHBP, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua de la secuencia de aminoácidos de fHbpN C-terminal ilustrada en la Fig. 13. Una fHBP quimérica ilustrativa que tiene dominios heterólogos contiene al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50 restos (y, en algunas realizaciones, no más de 50 restos) de una secuencia de aminoácidos C-extremo Contigua de un dominio fHbpN de una v.1 de fHBP.

El dominio fHbpN total o parcial se puede derivar del mismo grupo de variantes (y puede se puede derivar de la misma fHBP) como ciertas partes del dominio fHbpC. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos de fHbpN se puede derivar de un grupo de variantes de fHBP diferente del grupo de variantes de fHBP del que se deriva la secuencia de aminoácidos N-terminal del dominio fHbpC (por ejemplo, el dominio fHbpC se puede derivar de una v.2 de fHBP y la secuencia de aminoácidos C-terminal del dominio fHbpN derivarse de una v.1 de fHBP).

Como se ha indicado anteriormente, las fHBP quiméricas de la presente divulgación contienen la secuencia de aminoácidos de un dominio fHbpN de v.1. Las secuencias de aminoácidos de v.1 de fHBP, incluyendo los dominios fHbpN de v.1, son bien conocidas en la técnica, y se pueden usar para derivar la secuencia de aminoácidos deseada de una fHBP quimérica desvelada en el presente documento. La Fig. 13 proporciona las secuencias de aminoácidos C-terminales del dominio fHbpN de las v.1 de fHBP seleccionadas. La alineación ilustra la posición y la identidad de los polimorfismos naturales entre las v.1 de fHBP. La Figura 8A ilustra la identidad entre las secuencias de aminoácidos de las fHBP de longitud completa de las cepas v.1, v.2 y v.3 ilustrativas y, además, ilustra la presencia o la ausencia de epítomos definidos por los mAb JAR indicados. La Figura 8B ilustra la identidad entre las secuencias de aminoácidos de las v.1, v.2 y v.3 de fHBP ilustrativas, así como la identidad entre las secuencias de aminoácidos dentro de la parte C-terminal de fHbpN (101-135) y la parte N-terminal (136-164) de los dominios fHbpC.

Unión entre dominios heterólogos de una fHBP quimérica

Como se describirá a continuación más detalladamente, cabe señalar que, en el contexto de las fHBP quiméricas de la presente divulgación que tienen dominios heterólogos, la posición del punto de unión entre los dominios heterólogos puede estar presente dentro de o próxima al enlazador que conecta los dominios fHbpN y fHbpC. La glicina 136 define el límite entre fHbpN y fHbpC, y también marca el comienzo de la secuencia enlazadora. La secuencia enlazadora corresponde aproximadamente a los restos 136 a 149, e incluye la hélice α AH2. Por ejemplo, el punto de unión entre los dominios heterólogos de una fHBP quimérica puede estar situado C-extremo Con respecto a una secuencia correspondiente a la secuencia de GEHT subrayada en la Fig. 21. En algunas realizaciones, la unión puede ser de no más de 20, no más de 15, no más de 5 o de menos restos de aminoácidos de distancia de la secuencia de aminoácidos de GEHT o la secuencia enlazadora. En otras realizaciones en las que los dominios heterólogos están presentes en el dominio fHbpC, la unión entre los dominios heterólogos se puede situar C-extremo Con respecto a la glicina 164. La glicina 164 también se indica con una flecha en la Fig. 21.

Dominio fHbpC de la v.2 de fHBP y de v.3 de fHBP

Las fHBP quiméricas ilustrativas de la presente divulgación contienen dominios heterólogos que comprenden un dominio fHbpN total o parcial de un dominio fHbpN de v.1 de fHBP y un dominio fHbpC derivado de una v.2 (o v.3) de fHBP. Por conveniencia y claridad, el dominio fHbpC se puede definir estructuralmente como aquellos restos correspondientes a los restos 141-255 de v.1 de fHBP de MC58, estando la numeración basada en la secuencia de aminoácidos de v.1 de fHBP de MC58 que carece de la secuencia señal (Massignani *et al.*, 2003, *J Exp Med* 197:789-99) (Fig. 21).

Las secuencias de aminoácidos de la v.2 y la v.3 de fHBP, incluyendo los dominios fHbpN y fHbpC de v.2 y v.3 de fHBP, son bien conocidas en la técnica, y se pueden usar para derivar la secuencia de aminoácidos deseada de una fHBP quimérica desvelada en el presente documento. La Fig. 14 proporciona las secuencias de aminoácidos de los dominios fHbpC de longitud completa de las v.2 de fHBP seleccionadas. La alineación ilustra la posición y la identidad de los polimorfismos naturales entre las v.2 de fHBP. Las fHBP quiméricas ilustrativas incluyen las que

comprenden una secuencia de aminoácidos de fHbpC derivada de un dominio fHbpC de v.2 o v.3, que normalmente tiene una secuencia de aminoácidos contigua que es al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio fHbpC de una v.2 o v.3 de fHBP, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua de la secuencia de aminoácidos del dominio fHbpC, tal como las secuencias de v.2 ilustradas en la Fig. 14.

En ciertos casos, en lugar de tener la secuencia de aminoácidos de fHbpN derivada de una variante y la de fHbpC derivada de una variante diferente, el dominio fHbpC puede contener dos secuencias de aminoácidos contiguas derivadas de diferentes variantes. En los casos en que fHbpC contiene secuencias heterólogas, una secuencia de aminoácidos N-extremo Contigua de fHbpC puede ser al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua de la correspondiente secuencia de aminoácidos de una v.1 de fHBP.

PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE UNIÓN AL FACTOR H

Como se ha explicado anteriormente, la fHBP se puede describir en el contexto de los tres dominios asignados por Giuliani *et al.*, (*Infect Immun* 2005; 73:1151-60) o en el contexto de dos dominios estructurales tridimensionales. En aras de la brevedad, la divulgación adoptará la nomenclatura de los tres dominios, designados dominios A, B, y C. Sin embargo, toda la descripción en el contexto de los tres dominios funcionales se puede entender fácilmente en el contexto de los dos dominios estructurales basándose en lo que se ha detallado anteriormente.

De acuerdo con lo establecido anteriormente, las fHBP quiméricas de la presente divulgación normalmente incluyen bien un dominio B heterólogo y un dominio C; o un dominio B y un dominio C heterólogo. Dichas fHBP quiméricas se construyen de manera que contengan epítomos que generen anticuerpos bactericidas eficaces contra cepas de *N. meningitidis* productoras de más de una variante de fHBP.

La expresión "proteína quimérica de unión al factor H" o "fHBP quimérica" se refiere a un polipéptido que comprende, del extremo N al extremo C, una secuencia de aminoácidos de un dominio B y de un dominio C, en la que al menos uno entre el dominio B y el dominio C contiene una secuencia de aminoácidos heteróloga caracterizada por tener una parte N-terminal derivada de una secuencia de aminoácidos contigua de una v.1 de fHBP con el B restante y la parte C-terminal (o parte del extremo C) derivada de una secuencia de aminoácidos contigua de una v.2 o v.3 de fHBP. Las secuencias de aminoácidos del dominio B y/o del dominio C normalmente se derivan de una secuencia de aminoácidos contigua de una fHBP de origen natural y las mutantes de la misma que mantienen o introducen los epítomos deseados. La fHBP quimérica puede incluir opcionalmente una secuencia de aminoácidos de un dominio de A de fHBP unido operativamente y N-terminal al dominio B. La fHBP quimérica puede incluir además opcionalmente una secuencia líder, por ejemplo, para proporcionar la expresión de la fHBP quimérica en una superficie celular de una célula hospedadora bacteriana.

Cuando la fHBP quimérica contiene un dominio B heterólogo, en general, el dominio B heterólogo comprende al menos una parte N-terminal derivada de una secuencia de aminoácidos contigua de un dominio B de v.1 de fHBP y una parte C-terminal derivada de una secuencia de aminoácidos contigua de un dominio B de v.2 o v.3, estando el dominio B heterólogo unido operativamente a un dominio C derivado de una secuencia de aminoácidos contigua de un dominio C de v.2 o v.3 de fHBP. Así pues, por ejemplo, dicha fHBP quimérica se puede describir como aquella que tiene un dominio B heterólogo compuesto de una parte N-terminal para la que una secuencia de aminoácidos contigua correspondiente de una secuencia del dominio B de v.1 de fHBP sirve como armazón, y una parte C-terminal para la que una secuencia de aminoácidos contigua correspondiente de una secuencia del dominio B de v.2 o v.3 de fHBP B sirve como armazón.

Como se ha indicado anteriormente, la fHBP quimérica ilustrativa que tiene un dominio B heterólogo contiene al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50 restos (y, en algunas realizaciones, no más de 50 restos) de una secuencia de aminoácidos N-extremo Contigua de un dominio B de una v.1 de fHBP.

Cuando la fHBP quimérica contiene un dominio C heterólogo, el dominio B de la fHBP quimérica comprende una secuencia de aminoácidos contigua de un dominio B de v.1 de fHBP unido operativamente al dominio C heterólogo que comprende al menos una parte N-terminal del dominio C de una v.1 de fHBP y una parte C-terminal de un dominio C de v.2 o v.3. La fHBP quimérica ilustrativa de dicha realización contiene 2, 4, 6, 8 restos de una secuencia N-terminal de un dominio C de v.1, estando el resto del dominio C derivado de una secuencia de aminoácidos del dominio C de v.2 o v.3.

La fHBP quimérica contemplada por la presente divulgación incluye aquellas que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio B de longitud completa y un dominio C de longitud completa, y, opcionalmente, un dominio A de longitud completa, en la que la fHBP quimérica incluye al menos un dominio B heterólogo o un dominio C heterólogo. Otras realizaciones incluyen fHBP quiméricas que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a un fragmento de un dominio A compuesto de una secuencia de aminoácidos contigua que abarca aminoácidos que definen un epítomo unido por el mAb JAR 4. Otras realizaciones incluyen fHBP quiméricas en las que el dominio C está truncado en el extremo C, con la condición de que los epítomos de

interés (por ejemplo, uno o más de los epítomos unidos por los mAb JAR 10, JAR 11, JAR 33, JAR 32/35 y JAR 13) se conservan con el fin de mantener la capacidad de generar anticuerpos que se unan a estos epítomos. La fHBP quimérica también incluye aquellas que carecen de un dominio A, y tienen un dominio B truncado N-terminalmente, con la condición de que el dominio B truncado mantiene la expresión de uno o más epítomos de interés. Las fHBP quiméricas incluyen aquellas que tienen un dominio B que expresa un epítomo unido por el mAb JAR 5.

Los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento pueden incluir secuencias de aminoácidos heterólogos adicionales, por ejemplo, para proporcionar una metionina N-terminal o un derivado de la misma (por ejemplo, piroglutamato) como resultado de la expresión en una célula hospedadora bacteriana (por ejemplo, *E. coli*) y/o para proporcionar un polipéptido quimérico que tenga una pareja de fusión en su extremo N o su extremo C. Las parejas de fusión de interés incluyen, por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a la maltosa (MBP), marcador His₆, y similares, así como péptidos líder de otras proteínas, en particular, lipoproteínas. Las parejas de fusión pueden proporcionar características adicionales tales como facilitar el aislamiento y la purificación del polipéptido quimérico.

Habitualmente, la fHBP natural contiene una cisteína N-terminal a la que se puede unir covalentemente una fracción lipídica. Este resto de cisteína normalmente está lipidado en la proteína natural, y se puede lipidar en las fHBP quiméricas desveladas en el presente documento. Así pues, en las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento (incluyendo aquellas presentadas en el listado de secuencias), la referencia a "cisteína" o "C" en esta posición incluye específicamente la referencia tanto a una cisteína no modificada, como a una cisteína que está lipitada (por ejemplo, debido a la modificación posterior a la traducción). Por lo tanto, la fHBP quimérica puede estar lipitada o no lipitada. Los métodos de producción de proteínas lipidadas *in vitro*, (véase, por ejemplo, Andersson *et al.*, 2001 *J. Immunol. Methods* 255(1-2): 135-48) o *in vivo* son conocidos en la técnica. Por ejemplo, ya se ha purificado previamente fHBP lipitada de la fracción de membrana de la proteína de *E. coli* por extracción con detergente (Fletcher *et al.*, 2004 *Infection and Immunity* 72(4):2088-100), método que se pueden adaptar a la producción de fHBP quimérica lipitada. Las proteínas lipidadas pueden ser de interés, ya que pueden ser más inmunogénicas que la proteína soluble (véase, por ejemplo, Fletcher *et al.*, 2004 *Infection and Immunity* 72 (4): 2088-100).

A continuación, se describen las fHBP quiméricas ilustrativas en detalle.

fHBP quiméricas ilustrativas

Las fHBP quiméricas de la presente divulgación engloban aquellas que se pueden describir en términos de uno o más de entre, por ejemplo, el sitio en el que las secuencias heterólogas se unen dentro de la fHBP quimérica (es decir, el "punto de unión"), la presencia de epítomos unidos específicamente por un mAb, la secuencia de aminoácidos o cualquier combinación de dichas características que pueden estar presentes en las fHBP ilustrativas.

Punto de unión de la fHBP quimérica

En general, el punto de unión de la fHBP quimérica es el punto en el que la secuencia de aminoácidos de la fHBP quimérica cambia de estar derivada de una secuencia de aminoácidos contigua de una v.1 de fHBP a estar derivada de la secuencia de aminoácidos contigua de una v.2 o v.3 de fHBP. Por lo tanto, el punto de unión proporciona una secuencia de aminoácidos que es heteróloga, es decir, que deriva de diferentes fHBP. La parte N-terminal y las partes C-terminales de un dominio heterólogo (es decir, dominio B heterólogo o dominio C heterólogo) de la fHBP quimérica se unen en un punto de unión, punto de unión que define, por tanto, la longitud de las partes N-terminal y C-terminal del dominio quimérico que derivan de una secuencia de aminoácidos de v.1 o de v.2/v.3.

En general, una secuencia de aminoácidos del dominio B que comprende una secuencia de aminoácidos N-extremo Con respecto a la segunda hélice α de fHBP, que incluye restos correspondientes a los implicados en la definición del epítomo del mAb JAR 5 (es decir, restos en las posiciones 121 y 122 de un dominio B de v.1 de fHBP de MC58, que son glicina y lisina, respectivamente), se denota como la "parte N-terminal del dominio B" (véase, por ejemplo, Fig. 13, Fig. 21 y Fig. 22, grupo A). La secuencia de aminoácidos que flanquea y es C-extremo Con respecto a la parte N-terminal del dominio B es la "parte C-terminal (o distal) del dominio B" y se deriva de una secuencia de aminoácidos contigua de una v.2 o v.3 de fHBP (Fig. 14 y Fig. 22). En conjunto, las partes N-terminal y C-terminal del dominio B componen un dominio B heterólogo de una fHBP quimérica de la presente divulgación.

Cuando la fHBP quimérica tiene un dominio B heterólogo, el punto de unión puede estar situado en un resto adyacente a la segunda hélice α (AH2) (por ejemplo, adyacente y C-terminal a un resto correspondiente al resto 121 o 122 de la figura 21, por ejemplo, adyacente y C-terminal a uno de los restos de GEHTSFDK, por ejemplo, adyacente y C-terminal a uno de los restos de GEHT, N-terminal a AH2) o en una posición C-extremo Con respecto a AH2.

En una realización, el punto de unión del dominio B heterólogo puede estar situado en cualquier sitio que corresponda a un sitio posterior al resto de glicina o posterior al resto de lisina, que defina un epítomo de anticuerpo monoclonal (mAb) JAR 5 de una v. 1 de fHBP (resto que está situado en el dominio B, es decir, en G121 o K122 de

la secuencia de referencia de v.1 de fHBP de la cepa MC58) pero antes de un resto correspondiente a un resto que defina un epítipo del mAb JAR 11 de una v.2 de fHBP (resto que está situado en el dominio C, es decir, A174 de la secuencia de referencia de v.2 de fHBP de la cepa 8047). En una realización relacionada, el dominio B heterólogo se proporciona de modo que el epítipo del mAb JAR 5, el epítipo de JAR 11, o ambos epítipos de JAR 5 y JAR 11, se mantienen de modo que la fHBP quimérica es unida específicamente por el respectivo mAb.

En una realización, el punto de unión está situado de modo que la fHBP quimérica contiene un dominio B heterólogo, que tiene una parte N-terminal compuesta de una secuencia de aminoácidos contigua de una parte N-terminal de un dominio B de una v.1 de fHBP que contiene un epítipo de JAR 5 (definido en parte por G121 de la v.1 de fHBP de la cepa MC58) con la parte restante (es decir, la parte C-terminal) del dominio B derivada de una secuencia de aminoácidos contigua de la parte C-terminal correspondiente del dominio B de una v.2 o v.3 de fHBP. El dominio B heterólogo está unido operativamente a un dominio C derivado de una secuencia de aminoácidos contigua de una v.2 o v.3 de fHBP, que puede la misma o diferente v.2 o v.3 de fHBP que de la que se deriva la parte C-terminal del dominio B.

Los ejemplos de dominios B heterólogos incluyen aquellos que son al menos un 80 % idénticos, al menos un 85 % idénticos, al menos un 90 % idénticos, al menos un 99 % idénticos o más a una secuencia de aminoácidos contigua de una v.1 de fHBP correspondiente a los restos 101-121 , 101-122, 101-123, 101-124, 101-125, 101-126, 101-127, 101-128, 101-129, 101-130, 101-131, 101-132, 101-133, 101-134, 101-134, 101-136, 101-137, 101-138 o 101-139 de una secuencia de aminoácidos de v.1 de fHBP, estando la numeración basada en la fHBP de MC58 como referencia. Dichos dominios B heterólogos incluyen aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica, al menos un 85 % idéntica, al menos un 90 % idéntica, al menos un 99 % idénticos o más a una secuencia de aminoácidos contigua de una v.2 o v.3 de fHBP para proporcionar el dominio B heterólogo restante que tiene un extremo C correspondiente al resto 164 (de nuevo, usando la fHBP de MC58 como secuencia de referencia con el fin de la numeración).

Por ejemplo, cuando el dominio B heterólogo incluye los restos 101-122 o una v.1 de fHBP, la parte C-terminal del dominio B heterólogo incluye los restos 123 a 164 de una v.2 o v.3 de fHBP. Por consiguiente, la parte C-terminal del dominio B heterólogo puede incluir una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica, al menos un 85 % idéntica, al menos un 90 % idéntica, al menos un 99 % idéntica o más a una secuencia de aminoácidos contigua de una v.2 o v.3 de fHBP correspondiente a los restos 122-164, 123-164, 124-164, 125-164, 126-164, 127-164, 128-164, 129-164, 130-164, 131-164, 132-164, 133-164, 134-164, 135-164, 136-164, 137-164, 139-164 o 140-164, estando la parte N-terminal del dominio B heterólogo proporcionada por las secuencias de v.1 ilustradas anteriormente.

En otra realización, el punto de unión está situado N-terminal con respecto a la segunda hélice α (AH2), que se indican en la Figura 22 con " α ". Como se ha señalado anteriormente, los restos de GEHT están altamente conservados a través de las variantes v.1, v.2 y v.3 de fHBP, y por lo tanto, pueden servir como los restos convenientes del punto de unión, así como una referencia conveniente para la posición de un punto de unión en una fHBP quimérica. Por ejemplo, el punto de unión puede estar situado en 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 resto/s N-terminal/es a GEHT para proporcionar un dominio B heterólogo (por ejemplo, situado en un sitio no más de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 resto/s N-terminal/es de GEHT); o está situado en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 restos C-terminales con respecto a GEHT (por ejemplo, situado en un sitio no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 restos C-terminales de GEHT), donde un punto de unión en un sitio de menos de o igual a 26 restos C-terminales con respecto a GEHT proporciona un dominio B heterólogo y un punto de unión situado en más de 26 restos C-terminales con respecto a GEHT produce una fHBP quimérica que tiene un dominio C heterólogo.

Por ejemplo, el punto de unión del dominio B heterólogo se puede seleccionar de modo que la secuencia de aminoácidos del dominio B heterólogo situado N-terminal y que flanquea la secuencia de aminoácidos GEHT se deriva de una secuencia de aminoácidos del dominio B de v.1 de fHBP, y la secuencia de aminoácidos del dominio B heterólogo situada C-terminal y que flanquea la GEHT se deriva de una secuencia de aminoácidos del dominio B de v.2 o v.3 de fHBP.

En algunas realizaciones, el punto de unión se sitúa para proporcionar un dominio B heterólogo que comprenda una secuencia de aminoácidos que sea más del 80 % (por ejemplo, al menos un 81 %), al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % idéntica o idéntica a una secuencia de aminoácidos de QSHSALTAFAQ TEQIQDSEHS GK (SEC ID n.º 1), donde la secuencia de aminoácidos proporciona opcionalmente un epítipo que media la unión específica de un mAb JAR 5. Las sustituciones de aminoácidos ilustrativas de la secuencia anterior son las siguientes: QSHSALTA(F/L)Q TEQ(I/V/E)QD(S/P)E(H/D)S (G/E/R)K.

Las modificaciones ilustrativas de las secuencias de aminoácidos del dominio B heterólogo como se establece anteriormente incluyen, por ejemplo, una o más de las siguientes sustituciones de SEC ID n.º 1:

leucina (L) por fenilalanina (F) en un resto correspondiente a la posición 9;
valina (V) o ácido glutámico (E) por isoleucina (I) en la posición del resto 14;

prolina (P) por serina (S) en la posición del resto 17;
 ácido aspártico (D) por histidina (H) en la posición del resto 19;
 arginina (R) por glutamina (Q) en la posición del resto 28;
 valina (V) por alanina (A) en la posición del resto 35;
 5 glicina (G) por ácido aspártico (D) en la posición del resto 42; o
 lisina (K) por ácido glutámico (E) en la posición del resto 46.

En realizaciones adicionales, el dominio B heterólogo comprende una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula:

10 QSHSALTA(F/L)Q TEQ(I/V/E)QD(S/P)E(H/D)S (G/E/R)KMVAKR(Q/R)FR IGDI(A/V)GEHTA FNQLP (D/S)

En algunas realizaciones, el punto de unión se sitúa para proporcionar un dominio B heterólogo que comprenda una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % idéntica o idéntica a una secuencia de aminoácidos de

15 TEQIQDSEHS GKMLAKRQFR IGDIAGEHTA FNQLPD,

en la que la secuencia de aminoácidos proporciona opcionalmente un epítipo que media la unión específica de un mAb JAR 5.

En otras realizaciones, el dominio B heterólogo comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % idéntica o idéntica a una secuencia de aminoácidos de

25 QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GKMLAKRQFR IGDIAGEHTA FNQLPD

en la que la secuencia de aminoácidos proporciona opcionalmente un epítipo unido específicamente por el mAb JAR 5.

En otras realizaciones más, el dominio B heterólogo comprende una secuencia de al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % idéntica o idéntica a una secuencia de aminoácidos expuesta en la Fig. 13, que proporciona una alineación de las secuencias III, IV y V de las fHBP quiméricas ilustrativas en la región del punto de unión, que se indica con un recuadro. El resto G121, implicado en el epítipo de JAR 5 se muestra en **negrita y subrayado**.

En algunas realizaciones, el punto de unión se sitúa para proporcionar un dominio B heterólogo que comprenda una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % idéntica o idéntica a una secuencia de aminoácidos de:

40 LTAFQ TEQIQDSEHS **GKMLAKRQFR** IGDI

en la que la secuencia de aminoácidos proporciona opcionalmente un epítipo que media en la unión específica de un mAb JAR 5.

En otra realización, el punto de unión de la fHBP quimérica se sitúa de modo que la fHBP quimérica contiene un dominio C heterólogo compuesto de una secuencia de aminoácidos contigua de una parte N-terminal de un dominio C de una v.1 de fHBP y una secuencia de aminoácidos contigua de una parte C-terminal de un dominio C de una v.2 o v.3 de fHBP.

Por ejemplo, el punto de unión de una fHBP quimérica que tiene un dominio C heterólogo puede estar en las regiones de bucle del barril β del dominio C, o en cualquier segmento altamente conservado, por ejemplo en los restos D160 o I170. En una realización, el dominio C heterólogo incluye una secuencia N-terminal de KLTYTIDFA.

En los siguientes ejemplos, se proporciona la fHBP quimérica ilustrativa. La presente divulgación contempla estas fHBP quiméricas ilustrativas, así como la fHBP quimérica que tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de estas fHBP quiméricas ilustrativas (por ejemplo, Quimera I, Quimera II, Quimera IIb, Quimera III, Quimera IV y Quimera V). Las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico que codifican la Quimera I, Quimera II, Quimera IIb, Quimera III, Quimera IV y Quimera V se proporcionan en las Figuras 23, 24, 25, 26, 27 y 28, respectivamente. El asterisco indica el extremo C de la secuencia de aminoácidos (correspondiente al codón de terminación del ácido nucleico que codifica).

Inclusión o mantenimiento de pares de epítomos que generan anticuerpos que presentan mejor actividad bactericida cuando están unidos

5 La fHBP quimérica engloba la fHBP quimérica que contiene pares de epítomos que generan anticuerpos que, cuando ambos están unidos a sus respectivos epítomos, muestran una mayor actividad bactericida contra *N. meningitidis* que cuando solo está unido uno cualquiera. La fHBP quimérica se puede diseñar para garantizar que se mantengan dichos epítomos o para introducir dichos epítomos (por ejemplo, mediante la modificación de una secuencia de aminoácidos de fHBP para que incluya un par de epítomos heterólogos a la secuencia de aminoácidos de fHBP).

10 En general (y sometido a la excepción que figura más adelante), la distancia entre epítomos de dichos pares de epítomos se selecciona para que sea inferior a 27 Å, pero superior a 14 Å, y, por lo general, se encuentran dentro de una distancia de aproximadamente 18 Å a 20 Å. Como se trata en los siguientes ejemplos, se observó un mayor efecto bactericida cuando dos epítomos unidos por anticuerpos se situaban a distancias dentro de estos parámetros. Sin quedar vinculados por la teoría, cuando se están unidos por sus respectivos anticuerpos, la distancia entre los epítomos es suficiente para facilitar la interacción de los anticuerpos con los factores de la cascada del complemento, pero no tan cerca como para provocar la inhibición de la unión debida al impedimento estérico. Por lo tanto, la fHBP quimérica que contiene dichos epítomos para las cepas v.2 y v.3 puede dar lugar a la producción de anticuerpos que tengan una mayor actividad bactericida frente a dichas cepas. Los ejemplos de dichos pares de epítomos son los epítomos unidos por JAR 10 y JAR 11 (v.2 de fHBP); y JAR 33 y JAR 32/35 (JAR 32 y JAR 35 unen los mismos o epítomos superpuestos) (v.3 de fHBP).

25 Las fHBP quiméricas también puede incluir pares de epítomos en los que un epítomo del par esté definido por la unión por el mAb JAR 4 y el segundo epítomo esté unido por un anticuerpo que inhiba la unión de fH. Dicho par de epítomos no está necesariamente sujeto a las limitaciones de distancia entre los epítomos descritas anteriormente, con la condición de que los epítomos no estén tan cerca como para inhibir la unión de sus respectivos anticuerpos. Como se trata en los ejemplos que figuran a continuación, la unión de un anticuerpo que inhibe la unión de fH puede ser bactericida junto con otro mAb que no inhiba la unión de fH. Por ejemplo, un par de mAb tal como JAR 4 junto con cualquier mAb anti-v.1 o -v.2 que bloquea la unión de fH puede dar lugar a la producción de anticuerpos que tienen una mejor actividad bactericida.

30 **Inclusión o mantenimiento de epítomos que generan anticuerpos que inhiben la unión de fH**

35 Las fHBP quiméricas se pueden diseñar para que incluyan uno o más epítomos que generen anticuerpos que, cuando se unan a la fHBP, inhiban la unión de fH. Por ejemplo, como se indica a continuación, cuando los epítomos unidos por JAR 13 (epítomo v.2), JAR 11 (epítomo v.2) y JAR 32/35 (epítomo v.3) son unidos por el anticuerpo, se inhibe la unión de fHBP al fH. Por lo tanto, la presencia de dichos epítomos de unión de fH en los polipéptidos fHBP quiméricos puede proporcionar la producción de anticuerpos que pueden facilitar la protección a través de esta vía.

40 **Ácido nucleico que codifica la fHBP quimérica**

45 La fHBP quimérica se puede generar usando técnicas recombinantes para manipular los ácidos nucleicos de diferentes fHBP conocidos en la técnica por proporcionar construcciones que codifican una fHBP quimérica de interés. Como se ha indicado anteriormente, en la técnica, se dispone de ácidos nucleicos que codifican varias v.1, v.2 y v.3 de fHBP diferentes de *N. meningitidis*, y sus secuencias de nucleótidos son conocidas.

50 En las Figuras 23-28, se proporcionan secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de las fHBP quiméricas ilustrativas. Se apreciará que las secuencias de nucleótidos que codifican las fHBP quiméricas se pueden modificar para optimizar el uso de codones con el fin de facilitar la expresión en una célula hospedadora de interés (por ejemplo, *E. coli*, *N. meningitidis*, humana (como en el caso de una vacuna a base de ADN), y similares). Los métodos de producción de secuencias de codones optimizados se conocen en la técnica.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

55 Las fHBP quiméricas se pueden producir mediante cualquier método adecuado, incluyendo métodos recombinantes y no recombinantes (por ejemplo, síntesis química). Cuando la fHBP quimérica se produce usando técnicas recombinantes, los métodos pueden implicar cualquier construcción adecuada y cualquier célula hospedadora adecuada, que puede ser una célula procariota o eucariota, por lo general, una célula hospedadora bacteriana o de levadura, más habitualmente, una célula bacteriana. Los métodos de introducción de material genético en células hospedadoras incluyen, por ejemplo, transformación, electroporación, conjugación, métodos de fosfato de calcio y similares. El método para la transferencia se puede seleccionar para que proporcione la expresión estable del ácido nucleico que codifica la fHBP quimérica que se introduce. El ácido nucleico que codifica la fHBP quimérica se puede proporcionar como un elemento episomal heredable (por ejemplo, plásmido) o se puede integrar genómicamente.

65 Los vectores adecuados para la transferencia del ácido nucleico que codifica la fHBP quimérica pueden variar en composición. Los vectores integradores pueden ser plásmidos condicionalmente replicativos o suicidas, bacteriófagos, y similares. Las construcciones pueden incluir diversos elementos, incluyendo, por ejemplo,

- promotores, marcadores genéticos seleccionables (por ejemplo, genes que confieren resistencia a los antibióticos [por ejemplo, kanamicina, eritromicina, cloranfenicol o gentamicina]), origen de replicación (para potenciar la replicación en una célula hospedadora, por ejemplo, una célula hospedadora bacteriana), y similares. La elección del vector dependerá de varios factores tales como el tipo de célula en la que se desea la propagación y el fin de la propagación. Ciertos vectores son útiles para amplificar y fabricar grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para la expresión en células en cultivo. Otros vectores más son adecuados para la transferencia y la expresión en células en un animal entero. La elección del vector apropiado es competencia del experto en la materia. Muchos de dichos vectores se encuentran disponibles en el mercado.
- 5
- 10 En una realización, el vector es un vector de expresión basado en plásmidos episomales que contienen marcadores y elementos de resistencia a fármacos seleccionables que proporcionan la replicación autónoma en diferentes células hospedadoras (por ejemplo, tanto en *E. coli* como en *N. meningitidis*). Un ejemplo de dicho "vector lanzadera" es el plásmido pFP10 (Pagotto *et al.*, *Gene* 2000, 244:13-19).
- 15 Las construcciones se pueden preparar mediante, por ejemplo, la inserción de un polinucleótido de interés en la cadena principal de una construcción, normalmente, por medio de la unión de ADN ligasa a un sitio de enzima de restricción escindido del vector. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos deseada se puede insertar mediante recombinación homóloga o recombinación específica de sitio. Por lo general, la recombinación homóloga se realiza uniendo las regiones de homología al vector en los flancos de la secuencia de nucleótidos deseada, mientras que la recombinación específica de sitio se puede realizar a través del uso de secuencias que faciliten la recombinación específica de sitio (por ejemplo, cre-lox, sitios att, etc.). Se puede añadir ácido nucleico que contenga dichas secuencias, por ejemplo, mediante la ligadura de oligonucleótidos, o mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores que comprendan tanto la región de homología como una parte de la secuencia de nucleótidos deseada.
- 20
- 25 Los vectores pueden proporcionar el mantenimiento extracromosómico en una célula hospedadora o pueden proporcionar la integración en el genoma de la célula hospedadora. Los vectores se describen ampliamente en numerosas publicaciones bien conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, "Short Protocols in Molecular Biology", (1999) F. Ausubel, *et al.*, eds., Wiley & Sons. Los vectores pueden proporcionar la expresión de los ácidos nucleicos que codifican una fHBP quimérica, pueden proporcionar la propagación de los ácidos nucleicos en cuestión, o ambas.
- 30
- Los vectores ilustrativos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, los derivados de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido. Por ejemplo, se pueden usar vectores de plásmido tales como pBR322, pUC 19/18, pUC 118, 119 y la serie M13 mp de vectores. pET21 también es un vector de expresión que se puede usar. Los vectores de bacteriófagos pueden incluir λ gt10, λ gt11, λ gt18-23, λ ZAP/R y la serie de vectores de bacteriófago EMBL. Otros vectores que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación, pJB8, pCV 103, pCV 107, 108 pCV, pTM, pMCS, pNNL, pHSG274, COS202, COS203, pWE15, pWE16 y la serie de vectores charomid 9.
- 35
- 40 Para la expresión de una fHBP quimérica de interés, se puede emplear un casete de expresión. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico en cuestión. El vector de expresión proporciona secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción, y puede proporcionar la expresión inducible o constitutiva, estando la región codificante operativamente enlazada bajo el control transcripcional de la región de iniciación de la transcripción, y una región de terminación de la transcripción y de la traducción. Estas regiones de control pueden ser naturales de una fHBP a partir de la que se deriva la fHBP quimérica, o pueden derivar de fuentes exógenas. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir, pero sin limitación, secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, y pueden ser un promotor constitutivo potente (por ejemplo, T7, y similares).
- 45
- 50
- En general, los vectores de expresión tienen sitios de restricción convenientes situados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifiquen las proteínas de interés. Puede haber un marcador seleccionable operativo en el hospedador de expresión para facilitar la selección de células que contengan el vector. Además, la construcción de expresión puede incluir elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener uno o dos sistemas de replicación, permitiendo así su mantenimiento en los organismos, por ejemplo, en células de mamíferos o insectos para la expresión y en un hospedador procarionota para la clonación y la amplificación. Además, la construcción de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada.
- 55
- 60
- Cabe señalar que la fHBP quimérica de la presente divulgación puede comprender elementos adicionales, tales como un marcador detectable, por ejemplo, un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador de biotina, un marcador inmunológicamente detectable (por ejemplo, un marcador de HA, un marcador de poli-histidina) y similares. Se pueden proporcionar elementos adicionales de fHBP quimérica para facilitar el aislamiento (por ejemplo, un marcador de biotina, un marcador inmunológicamente detectable) a través de diversos métodos (por
- 65

ejemplo, la captura de afinidad, etc.). Opcionalmente, la fHBP quimérica se puede inmovilizar sobre un soporte a través de la unión covalente o no covalente.

5 El aislamiento y la purificación de fHBP quimérica se pueden realizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la fHBP quimérica se puede aislar de un lisado de células modificadas genéticamente para expresar una fHBP quimérica, o de una mezcla de reacción sintética, mediante purificación por inmovilización, que generalmente implica poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-fHBP quimérica (por ejemplo, un mAb anti-fHBP quimérica, tal como un mAb JAR 5 u otro mAb JAR apropiado descrito en el presente documento), lavar para eliminar el material unido no específicamente y eluir la fHBP quimérica unida específicamente. La fHBP quimérica aislada se puede purificar además mediante diálisis y otros métodos normalmente empleados en los métodos de purificación de proteínas. En una realización, la fHBP quimérica se puede aislar usando métodos de cromatografía de quelatos metálicos.

Células hospedadoras

15 En la producción de fHBP quiméricas, se puede usar cualquiera de una serie de células hospedadoras adecuadas. En general, la fHBP quimérica descrita en el presente documento se puede expresar en organismos procariontes o eucariotes, generalmente bacterias, más habitualmente *E. coli* o *Neisseria* (por ejemplo, *N. meningitidis*) de acuerdo con técnicas convencionales. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona además una célula hospedadora genéticamente modificada que contiene un ácido nucleico que codifica una fHBP quimérica. Las células hospedadoras para la producción (incluyendo la producción a gran escala) de una fHBP quimérica se pueden seleccionar de cualquiera de varias células hospedadoras disponibles. Las células hospedadoras ilustrativas para la expresión incluyen las de un organismo unicelular procarionte o eucariote, tal como bacterias (por ejemplo, cepas de *Escherichia coli*), levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia* sp., y similares), y pueden incluir células hospedadoras derivadas originariamente de un organismo superior tal como insectos, vertebrados, particularmente mamíferos, (por ejemplo, CHO, HEK, y similares). En general, las células hospedadoras bacterianas y las levaduras son de particular interés para la producción de fHBP quiméricas.

30 Las fHBP quiméricas se pueden preparar en forma sustancialmente pura o sustancialmente aislada (es decir, sustancialmente exenta de otros polipéptidos de *Neisseria* o de células hospedadoras) o forma sustancialmente aislada. En ciertas realizaciones, la fHBP quimérica está presente en una composición que está enriquecida en el polipéptido con respecto a otros componentes que pueden estar presentes (por ejemplo, otros polipéptidos u otros componentes de la célula hospedadora). Se puede proporcionar fHBP quimérica purificada de manera que el polipéptido está presente en una composición que está sustancialmente exenta de otros polipéptidos expresados, por ejemplo, menos del 90 %, normalmente menos del 60 % y más normalmente menos del 50 % de la composición está constituido por otros polipéptidos expresados.

Células hospedadoras para la producción de vesículas

40 Cuando se va a proporcionar una fHBP quimérica en una vesícula de membrana (como se explica en detalle más adelante), se modifica genéticamente una célula hospedadora de *Neisseria* para que exprese una fHBP quimérica. Se puede modificar cualquiera de varias cepas de *Neisseria* sp. para producir una fHBP quimérica, que, opcionalmente, produzca o se pueda modificar para que produzca otros antígenos de interés, tales como PorA, que se pueden usar en los métodos desvelados en el presente documento.

45 Los métodos y vectores para proporcionar la modificación genética de cepas de *Neisseria* y la expresión de un polipéptido deseado son conocidos en la técnica. En el documento WO 02/09746 y en O'Dwyer *et al. Infect Immun* 2004; 72:6511-80, se proporcionan vectores y métodos ilustrativos. Son de particular interés los promotores potentes, particularmente, los promotores potentes constitutivos. Los promotores ilustrativos incluyen los promotores de porA, porB, lbpB, tpbB, p110, hpuAB, lgtF, opa, p110, lst, hpuAB y rmp.

50 La especie *Neisseria* patógena o las cepas derivadas de especies de *Neisseria* patógenas, especialmente, las cepas patógenas para el ser humano o las derivadas de las cepas patógenas o comensales para el ser humano, son de particular interés para su uso en la producción de vesículas de membrana. Las especies de *Neisseria* ilustrativas incluyen *N. meningitidis*, *N. flavescens*, *N. gonorrhoea*, *N. lactamica*, *N. polysaccharea*, *N. cinerea*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *N. sicca*, *N. elongata*, y similares.

60 Las cepas de *N. meningitidis* son de particular interés para la modificación genética destinada a expresar una fHBP quimérica y para su uso en la producción de vesículas. La cepa usada para la producción de vesículas se puede seleccionar de acuerdo con una serie de características diferentes que se pueden desear. Por ejemplo, la cepa se puede seleccionar de acuerdo con: un tipo de PorA deseado (un "serosubtipo", como se ha descrito anteriormente), grupo capsular, serotipo, y similares; la reducción de la producción de polisacárido capsular; y similares. Por ejemplo, la cepa de producción puede producir cualquier polipéptido PorA deseado, y puede expresar uno o más polipéptidos PorA (ya sea de manera natural o por la ingeniería genética). Las cepas ilustrativas incluyen las que producen un polipéptido PorA que confiere un serosubtipo de P1.7,16; P1.19,15; P1.7,1; P1.5,2; P1.22a,14; P1.14; P1.5,10; P1.7,4; P1.12,13; así como variantes de dichos polipéptidos PorA que pueden o no pueden retener

reactividad con reactivos serológicos convencionales usados en la serosubtipificación. También son de interés los polipéptidos PorA caracterizados de acuerdo con la tipificación de regiones variables (VR) de PorA (véase, por ejemplo, Russell *et al. Emerging Infect Dis* 2004 10:674-678; Sacchi C. T., *et al. Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:845-55; Sacchi *et al. J. Infect Dis* 2000;182:1169-1176). Se ha identificado un número considerable de tipos de VR distintos, que se pueden clasificar en "prototipos" de las familias VR1 y VR2. En neisseria.org/nm/typing/pora, se encuentra una base de datos accesible en la Web que describe dicha nomenclatura y su relación con los esquemas de tipificación anteriores. En Russell *et al. Emerging Infect Dis* 2004 10:674-678, se proporcionan alineaciones de los tipos de PorA VR1 y VR2 ilustrativos.

10 Como alternativa o además, la cepa de producción puede ser una cepa deficiente en cápsula. Las cepas deficientes en cápsula pueden proporcionar vacunas a base de vesículas que proporcionan un menor riesgo de provocar una respuesta de autoanticuerpos significativa en un sujeto al que se administre la vacuna (por ejemplo, debido a la producción de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el ácido siálico en las superficies las células hospedadoras). "Deficiente en cápsula" o "deficiente en polisacárido capsular", como se usan en el presente documento, se refieren a un nivel de polisacárido capsular en la superficie bacteriana que es inferior al de una cepa de origen natural o, cuando la cepa se ha modificado genéticamente, que es inferior al de una cepa parental de la que se deriva la cepa deficiente en cápsula. Una cepa deficiente en cápsula incluye cepas que tienen una reducción de la producción de polisacárido capsular superficial de al menos 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más, e incluye cepas en las que el polisacárido capsular no es detectable en la superficie bacteriana (por ejemplo, mediante ELISA de células enteras usando un anticuerpo anti-polisacárido capsular).

Las cepas deficientes en cápsula incluyen aquellas que son deficientes en cápsula debido a una modificación genética de origen natural o generada por recombinación. Las cepas deficientes en cápsula de origen natural (véase, por ejemplo, Dolan-Livengood *et al. J. Infect. Dis.* (2003) 187(10):1616-28), así como los métodos de identificación y/o generación de cepas deficientes de cápsula (véase, por ejemplo, Fisseha *et al.* (2005) *Infect. Immun.* 73(7):4070-4080; Stephens *et al.* (1991) *Infect Immun* 59(11):4097-102; Frosch *et al.* (1990) *Mol Microbiol.* 1990 4(7):1215-1218) son conocidos en la técnica.

La modificación de una célula hospedadora de *Neisseria* para reducir la producción de polisacárido capsular puede incluir la modificación de uno o más genes implicados en la síntesis de la cápsula, cuando la modificación da lugar, por ejemplo, a la reducción de los niveles de polisacárido capsular con respecto a una célula parental antes de la modificación. Dichas modificaciones genéticas pueden incluir cambios en las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos de uno o más genes de la biosíntesis de la cápsula volviendo a la cepa deficiente en cápsula (por ejemplo, debido a una o más inserciones, eliminaciones, sustituciones, y similares, en uno o más genes de la biosíntesis de la cápsula). Las cepas deficientes en cápsula pueden carecer o ser no funcionales para uno o más genes de la cápsula.

Son de particular interés las cepas que son deficientes en la biosíntesis del ácido siálico. Dichas cepas pueden proporcionar la producción de vesículas que tengan un menor riesgo de generar anticuerpos anti-ácido siálico que reaccionen de forma cruzada con los antígenos de ácido siálico humanos, y pueden proporcionar además una mejor seguridad de fabricación. Las cepas que tienen un defecto en la biosíntesis del ácido siálico (ya sea debido a una modificación de origen natural o a una modificación por ingeniería genética) pueden ser defectuosas en cualquiera de una serie de diferentes genes de la vía de biosíntesis del ácido siálico. Son de particular interés las cepas que son defectuosas en un producto génico codificado por el gen N-acetilglucosamina-6-fosfato 2-epimerasa (conocido como synX AAF40537.1 o siaA AAA20475), siendo de particular interés las cepas que tienen este gen inactivado. Por ejemplo, en una realización, se genera una cepa deficiente en cápsula mediante la interrupción de la producción de un producto génico synX funcional (véase, por ejemplo, Swartley *et al.* (1994) *J Bacteriol.* 176(5):1530-4).

Las cepas deficientes en cápsula también se pueden generar a partir de cepas de origen natural usando técnicas no recombinantes, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos anti-capsulares bactericidas para seleccionar las cepas que reducen la producción de polisacárido capsular.

Cuando la divulgación implica el uso de dos o más cepas (por ejemplo, para producir composiciones antigénicas que contengan vesículas presentadoras de fHBP quimérica de diferentes cepas), las cepas se pueden seleccionar de manera que se diferencien en una o más características de las cepas, por ejemplo, para proporcionar vesículas que difieran en la fHBP quimérica usada, PorA, y similares.

Preparación de las vesículas

60 Las composiciones antigénicas contempladas por la presente divulgación incluyen, en general, las vesículas preparadas a partir de células de *Neisseria* que expresan una fHBP quimérica. Como se hace referencia en el presente documento, se entiende que el término "vesículas" engloba vesículas de membrana externa, así como microvesículas (también conocidas como ampollas).

65 En una realización, la composición antigénica comprende vesículas de membrana externa (OMV) preparadas a partir de la membrana externa de una cepa cultivada de la especie *Neisseria meningitidis* modificada genéticamente

para expresar una fHBP quimérica. Las OMV se pueden obtener a partir de *Neisseria meningitidis* cultivada en caldo o medio de cultivo sólido, preferentemente separando las células bacterianas del medio de cultivo (por ejemplo, por filtración o por una centrifugación a baja velocidad de sedimentos celulares, o similares), la lisis de las células (por ejemplo, mediante la adición de detergente, choque osmótico, sonicación, cavitación, homogeneización, o similares) y la separación de una fracción de membrana externa de moléculas citoplásmicas (por ejemplo, por filtración, o por precipitación diferencial o agregación de membranas externas y/o vesículas de membrana externa, o mediante métodos de separación por afinidad usando ligandos que reconocen específicamente moléculas de la membrana externa, o por una centrifugación de alta velocidad de sedimentos de membranas externas y/o vesículas de membrana externa, o similares); se pueden usar fracciones de membrana externa para producir las OMV.

En otra realización, la composición antigénica comprende microvesículas (MV) (o "ampollas") que contienen fHBP quimérica, donde las MV o ampollas se liberan durante el cultivo de una cepa de *Neisseria meningitidis* modificada genéticamente para expresar una fHBP quimérica. Por ejemplo, las MV se pueden obtener mediante el cultivo de una cepa de *Neisseria meningitidis* en medio de cultivo de caldo, separando las células enteras del medio de cultivo de caldo (por ejemplo, por filtración o por una centrifugación a baja velocidad que aglomera solamente las células y no las ampollas más pequeñas, o similares), y luego la recogida de las MV que están presentes en el medio de cultivo exento de células (por ejemplo, por filtración, precipitación diferencial o agregación de las MV, o por una centrifugación de alta velocidad que aglomera las ampollas, o similares). En general, las cepas para su uso en la producción de MV se pueden seleccionar basándose en la cantidad de ampollas producidas en cultivo (por ejemplo, las bacterias se pueden cultivar en un número razonable para producir las ampollas adecuadas para el aislamiento y la administración en los métodos descritos en el presente documento). Una cepa ilustrativa que produce altos niveles de ampollas se describe en la publicación PCT n.º WO 01/34642. Además de la producción de ampollas, las cepas para su uso en la producción de MV también se pueden seleccionar basándose en la producción de NspA, pudiendo ser de particular interés las cepas que producen niveles más altos de NspA (para consultar ejemplos de cepas de *N. meningitidis* que tienen diferentes niveles de producción de NspA, véase, por ejemplo, Moe *et al.* (1999, *Infect. Immun.* 67: 5664). Otras cepas de interés para su uso en la producción de ampollas incluyen cepas que tienen un gen GN33 inactivado que codifica una lipoproteína necesaria para la separación celular, la arquitectura de la membrana y la virulencia (véase, por ejemplo, Adu-Bobie *et al. Infect Immun.* 2004; 72: 1914-1919).

Las composiciones antigénicas de la presente divulgación pueden comprender vesículas de una cepa, o de 2, 3, 4, 5 o más cepas, pudiendo ser las cepas homólogas o heterólogas, por lo general, heterólogas, entre sí. Por ejemplo, las cepas pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a PorA. En una realización, se pueden preparar vesículas a partir de cepas que expresen más de una fHBP quimérica (por ejemplo, 1, 2, 3 o más fHBP quiméricas) que puede estar compuesta de secuencias de aminoácidos de diferentes variantes (v.1, v.2 o v.3) o subvariantes (por ejemplo, una subvariante de v.1, v.2 o v.3) de fHBP.

Las composiciones antigénicas pueden comprender una mezcla de OMV y MV que presentan las mismas fHBP quiméricas o diferentes, pudiendo presentar las fHBP quiméricas opcionalmente epítopos de diferentes combinaciones de variantes y/o subvariantes de fHBP, y pudiendo proceder las OMV y/o MV de las mismas o diferentes cepas. Es posible administrar vesículas de diferentes cepas como una mezcla, o se pueden administrar en serie.

Cuando se desee (por ejemplo, cuando las cepas usadas para producir vesículas están asociadas con endotoxina o niveles particularmente altos de endotoxina), las vesículas se tratan opcionalmente para reducir la endotoxina, por ejemplo, para reducir la toxicidad tras la administración. Aunque es menos deseable, como se tratará a continuación, la reducción de endotoxina se puede realizar mediante extracción con un detergente adecuado (por ejemplo, BRIJ-96, desoxicolato de sodio, lauroilsarcosinato de sodio, Empigen BB, Triton X-100, TWEEN 20 (monolaurato de polioxi-etileno de sorbitán), TWEEN 80, a una concentración del 0,1 al 10 %, preferentemente del 0,5 al 2 %, y SDS). Cuando se usa la extracción con detergente, es preferible usar un detergente que no sea desoxicolato.

En algunas realizaciones, las vesículas de las composiciones antigénicas se preparan sin detergente, por ejemplo, sin el uso de desoxicolato. Aunque el tratamiento de detergente es útil para eliminar la actividad de la endotoxina, puede agotar la lipoproteína fHBP natural y/o fHBP quimérica (incluyendo la fHBP quimérica lipidada) por la extracción durante la producción de vesículas. Por lo tanto, puede ser particularmente deseable reducir la actividad de la endotoxina usando tecnología que no requiera un detergente. En una metodología, se usan cepas que producen niveles relativamente bajos de endotoxina (lipopolisacárido, LPS) para evitar la necesidad de eliminar la endotoxina del preparado final antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, las vesículas se pueden preparar a partir de mutantes de *Neisseria* en los que se reduzcan o eliminen los lipooligosacáridos u otros antígenos que puedan no ser deseados en una vacuna (por ejemplo, Rmp).

Las vesículas se puede preparar a partir de cepas de *N. meningitidis* que contengan modificaciones genéticas que den lugar a la reducción o a ninguna actividad tóxica detectable del lípido A. Por ejemplo, dicha cepa se puede modificar genéticamente en la biosíntesis del lípido A (Steeghs *et al. Infect Immun* 1999; 67:4988-93; van der Ley *et al. Infect Immun* 2001; 69:5981-90; Steeghs *et al. J Endotoxin Res* 2004; 10:113-9; Fissaha *et al. Infect Immun* 73:4070, 2005). Las composiciones inmunogénicas pueden ser desintoxicadas mediante la modificación de LPS, tal como la regulación a la baja y/o la inactivación de las enzimas codificadas por lpxL1 o lpxL2, respectivamente. La

producción de un lípido A penta-acilado creado en mutantes lpxL1 indica que la enzima codificada por lpxL1 añade el C12 al C14 3-OH enlazado en N en la posición 2' de GlcN II. La principal especie de lípido A que se encuentra en los mutantes lpxL2 está tetra-acilada, lo que indica que la enzima codificada por lpxL2 añade el otro C12, es decir, C14 3-OH enlazado en N en la posición 2 de GlcN I. Las mutaciones que reducen (o anulan) la expresión de estos genes (o reducen o anulan la actividad de los productos de estos genes) dan lugar a una actividad tóxica modificada del lípido A (van der Ley *et al* 2001; 69:5981-90). El lípido A tetra-acilado (mutante lpxL2) y pentaacilado (mutante lpxL1) son menos tóxicos que los lípidos A de tipo silvestre. Las mutaciones en el gen que codifica la lípido A 4'-quinasa (lpxK) también disminuyen la actividad tóxica del lípido A. Son de particular interés para su uso en la producción de vesículas (por ejemplo, MV o OMV) las cepas de *N. meningitidis* modificadas genéticamente para proporcionar la reducción o anulación de proteína codificada por lpxL1 funcional detectable. Dichas vesículas proporcionan toxicidad reducida en comparación con las cepas de *N. meningitidis* que son de tipo silvestre para la producción de LPS, a la vez que conservan la inmunogenicidad de la fHBP química.

También es posible modificar la actividad tóxica de los LPS mediante la introducción de mutaciones en los genes/loci implicados en la resistencia a la polimixina B (dicha resistencia se ha correlacionado con la adición de aminoarabinosa en el fosfato 4' del lípido A). Estos genes/loci podrían ser pmrE que codifica una UDP-glucosa deshidrogenasa, o una región de genes de resistencia a péptidos antimicrobianos comunes a muchas enterobacterias que podrían estar implicadas en la síntesis y transferencia de aminoarabinosa. El gen pmrF que está presente en esta región codifica una dolicol-fosfato manosil transferasa (Gunn J. S., Kheng, B. L., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S. I. 1998. *Mol. Microbiol.* 27: 1171-1182).

Las mutaciones en el sistema regulador PhoP-PhoQ, que es un sistema regulador de dos componentes basado en fosfo (por ejemplo, fenotipo constitutivo PhoP, PhoPc), o condiciones ambientales o de cultivo bajas en Mg⁺⁺ (que activan el sistema regulador PhoP-PhoQ) conducen a la adición de aminoarabinosa en el fosfato 4' y 2-hidroximiristato de sustitución del miristato (hidroxilación del miristato). Este lípido A modificado muestra una capacidad reducida para estimular la expresión de E-selectina por las células endoteliales humanas y la secreción de TNF de monocitos humanos.

También son adecuadas para su uso las cepas resistentes a la polimixina B, pues dichas cepas han mostrado tener una menor toxicidad de los LPS (véase, por ejemplo, van der Ley *et al.* 1994. en: "Proceedings of the ninth international pathogenic Neisseria conference". The Guildhall, Winchester, Inglaterra). Como alternativa, se pueden añadir péptidos sintéticos que imitan la actividad de unión de la polimixina B a las composiciones antigénicas para reducir la actividad tóxica de los LPS (véase, por ejemplo, Rustici *et al.* 1993, *Science* 259:361-365; Porro *et al.* *Prog Clin Biol Res.* 1998; 397:315-25).

La endotoxina también se puede reducir mediante la selección de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, el cultivo de la cepa en un medio de crecimiento que contenga de 0,1 mg a 100 mg de aminoarabinosa por litro de medio proporciona una reducción de la toxicidad de los lípidos (véase, por ejemplo, el documento WO 02/097646).

FORMULACIONES

Las expresiones "composición de antígeno", "composición antigénica" o "composición inmunogénica" se usan en el presente documento por una cuestión de conveniencia para referirse genéricamente a composiciones que comprenden una fHBP química según lo desvelado en el presente documento, fHBP química que puede estar opcionalmente conjugada para mejorar aún más la inmunogenicidad. Las composiciones útiles para generar anticuerpos, en particular, anticuerpos contra el grupo B de *Neisseria meningitidis* (NmB), en un ser humano se contemplan específicamente por la presente divulgación. Las composiciones antigénicas pueden contener 2 o más fHBP químicas diferentes, donde las fHBP químicas pueden presentar epítopos de diferentes combinaciones de variantes y/o subvariantes de fHBP.

Las composiciones antigénicas comprenden, en general, una cantidad inmunológicamente eficaz de fHBP química, y pueden incluir además otros componentes compatibles, según sea necesario. La expresión "cantidad inmunológicamente eficaz" pretende significar que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una sola dosis, como parte de una serie de las mismas composiciones antigénicas o diferentes composiciones antigénicas, es eficaz para provocar una respuesta de anticuerpos eficaz para el tratamiento o la prevención de un síntoma de, o de una enfermedad causada por, por ejemplo, la infección por *Neisseria*, particularmente *N. meningitidis*, más particularmente *N. meningitidis* del grupo B. Esta cantidad varía dependiendo del estado de salud y del estado físico del individuo que se vaya a tratar, de la edad, de la capacidad del sistema inmune del individuo para producir anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación que el médico tratante realice de la situación médica y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse mediante ensayos habituales.

La pauta de dosificación puede ser un programa de monodosis o un programa de multidosis (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo) con una forma de dosificación unitaria de la composición antigénica administrada en momentos diferentes. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales,

conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de las composiciones antigénicas de la presente invención en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, composiciones que se proporcionan en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable). La composición antigénica se puede administrar en combinación con otros agentes inmunorreguladores.

5 Las composiciones antigénicas se pueden proporcionar en un excipiente farmacéuticamente aceptable, que puede ser una solución tal como una solución acuosa estéril, normalmente, una solución salina, o que se pueden proporcionar en forma de polvo. Si se desea, dichos excipientes pueden ser sustancialmente inertes.

10 Las composiciones antigénicas pueden comprender además un adyuvante. Los ejemplos de adyuvantes adecuados conocidos que se pueden usar en los seres humanos incluyen, pero sin limitarse necesariamente a, alumbre, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, MF59 (escualeno al 4,3 % p/v, Tween 80™ al 0,5 % p/v, Span 85 al 0,5 % p/v), ácido nucleico que contiene CpG (donde la citosina no está metilada), QS21, MPL, 3dMPL, extractos de Aquilla, ISCOMs, mutantes LT/CT, micropartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG), Quil A, interleucinas, y similares.

15 Para los animales experimentales, se puede usar de Freund, *N*-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), *N*-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A monofosforílico, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80. La eficacia de un adyuvante se puede determinar midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el antígeno inmunogénico o epítipo antigénico del mismo.

Los adyuvantes adicionales ilustrativos para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación: (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase más abajo) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59™ (documento WO 90/14837; Capítulo 10 de "Vaccine design: the subunit and adjuvant approach", eds. Powell & Newman, Plenum Press, 1995), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador; (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado con pluronic al 5 % y thr-MDP bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometido a movimientos vorticiales para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula; y (c) sistema de adyuvantes RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana, tales como monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (2) se pueden usar adyuvantes de saponina tales como QS21 o Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, Mass.) o partículas generadas a partir de los mismos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), ISCOM que pueden estar desprovistos de un detergente adicional, por ejemplo, el documento WO 00/07621; (3) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (4) citoquinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo, interferón γ), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) monofosforil-lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL), por ejemplo, los documentos GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos neumocócicos, por ejemplo, documento WO 00/56358; (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, por ejemplo, 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 *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 810-876; Chu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveami *et al.*, "Vaccine", 1988, 16, 1216-1224, Krieg *et al.*, *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, *Cell Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; y Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 55 160, 5898-5906; solicitudes de patente internacional WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 y WO 98/52581), es decir, que contiene al menos un dinucleótido CG, donde la citosina está desmetilada; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo, el documento WO 99/52549; (9) un tensioactivo de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO 01/21207) o un tensioactivo de polioxietilentalquiléter o polioxietilentalquiléter en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO 01/21152); (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) (documento WO 00/62800); (11) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica, por ejemplo, el documento WO 00/23105; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo, el documento WO 99/11241; (13) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IM2 (opcionalmente + un estero) por ejemplo, el documento WO 98/57659; (14) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición. Los péptidos de muramilo incluyen *N*-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), *N*-25-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarninil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc. Son de particular interés los adyuvantes adecuados para la administración a un ser humano.

Las composiciones antigénicas pueden comprender otros componentes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requieran para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y agentes
5 tampón, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares.

La concentración de fHBP quimérica de una formulación puede variar ampliamente (por ejemplo, de menos del aproximadamente 0,1 %, normalmente a o al menos aproximadamente 2 % hasta tanto como del 20 % al 50 % o
10 más en peso) y, por lo general, se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades y factores basados en el paciente de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

Las formulaciones que contienen fHBP quimérica se pueden proporcionar en forma de una solución, suspensión,
15 comprimido, píldora, cápsula, polvo, gel, crema, loción, pomada, aerosol o similares. Se reconoce que la administración oral puede requerir proteger las composiciones de la digestión. Esto, por lo general, se realiza bien mediante la asociación de la composición con un agente que la vuelva resistente a la hidrólisis ácida y enzimática o mediante el envasado de la composición en un vehículo apropiadamente resistente. Los medios de protección de la digestión son bien conocidos en la técnica.

Las formulaciones que contienen fHBP quimérica también se pueden proporcionar para que aumenten la semivida
20 en suero de la fHBP quimérica tras la administración. Por ejemplo, cuando las fHBP quiméricas aisladas se formulan para inyección, la fHBP quimérica se puede proporcionar en una formulación de liposomas, preparada en forma de coloide, u otras técnicas convencionales para prolongar la semivida en suero. Hay varios métodos disponibles para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467 (1980), patentes de EE.UU. n.º 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. Las preparaciones también se pueden proporcionar en formas de liberación lenta o de liberación controlada.

INMUNIZACIÓN

En general, las composiciones antigénicas que contienen fHBP quiméricas se administran a un sujeto humano que se encuentre en riesgo de adquirir una enfermedad producida por *Neisseria* con el fin de prevenir o al menos detener parcialmente el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para el uso terapéutico dependerán de,
35 por ejemplo, la composición antigénica, la forma de administración, el peso y el estado general de salud del paciente, y el juicio del médico que las prescribe. Se pueden administrar monodosis y multidoses de las composiciones antigénicas dependiendo de la dosificación, y de la frecuencia requerida y tolerada por el paciente, y la vía de administración.

Las composiciones antigénicas que contienen fHBP quimérica generalmente se administran en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmune, particularmente una respuesta inmune humoral, en el hospedador. Como se ha indicado anteriormente, las cantidades para la inmunización serán variables, pudiendo variar generalmente de aproximadamente 1 µg a 100 µg por paciente de 70 kg, normalmente, de 5 µg a 50 µg/70 kg. Las dosis sustancialmente más elevadas (por ejemplo, de 10 mg a 100 mg o superiores) pueden ser adecuadas en las vías de
45 administración oral, nasal o tópica. A la administración inicial le puede seguir la inmunización de refuerzo de la misma o diferente composición antigénica que contiene fHBP quimérica. Por lo general, la vacunación implica al menos un refuerzo, más generalmente dos refuerzos.

En general, la inmunización se puede realizar mediante la administración por cualquier vía adecuada, incluyendo la administración de la composición por vía oral, nasal, nasofaringea, parenteral, entérica, gástrica, tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, en comprimido, en forma sólida, en polvo, en forma líquida, en forma de aerosol, local o sistémicamente, con o sin excipientes añadidos. Los métodos reales de preparación de composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia, y se describen más detalladamente en publicaciones tales como "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed., Mack
50 Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

La respuesta inmune anti-fHBP quimérica se puede evaluar mediante métodos conocidos (por ejemplo, mediante la obtención de suero del individuo antes y después de la inmunización inicial, y la demostración de un cambio en el estado inmune del individuo, por ejemplo, un ensayo de inmunoprecipitación o un ELISA, o un ensayo bactericida o una transferencia Western o ensayo de citometría de flujo, o similar).
60

En una realización, las composiciones antigénicas se pueden administrar a un sujeto humano que no haya sido tratado previamente inmunológicamente con respecto a *Neisseria meningitidis*. En una realización particular, el sujeto es un niño humano de aproximadamente cinco años o edad inferior, y preferentemente de aproximadamente
65 dos años o edad inferior, y las composiciones antigénicas se administran en uno o más de los siguientes momentos, a las dos semanas, al mes, a los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 meses, o a un año o 15, 18 o 21 meses del nacimiento,

o a los 2, 3, 4 o 5 años de edad.

Puede ser deseable, en general, iniciar la inmunización antes del primer signo de síntoma de la enfermedad, o en el primer signo de una posible exposición o exposición real a la infección o la enfermedad (por ejemplo, debido a la exposición o infección por *Neisseria*).

Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son solo con fines ilustrativos, y que los expertos en la materia sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos, que estarán incluidos dentro del espíritu y del alcance de la presente solicitud, y del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los ejemplos que figuran más adelante, se usaron los siguientes métodos y materiales.

Clonación de genes. Se amplificaron genes de fHBP de tipo silvestre a partir de ADN genómico por PCR, y se clonaron en pGEM-T-Easy (Promega). Se trataron los plásmidos resultantes con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, y se ligaron los fragmentos de aproximadamente 800 pares de bases que contenían las secuencias de codificación de fHBP en pET21b (Novagen) cortado con las dos mismas enzimas. Se confirmaron los clones de plásmido mediante la determinación de la secuencia de ADN de los productos de PCR obtenidos mediante la amplificación del plásmido con cebadores específicos del promotor T7 y las regiones terminadoras. Los plásmidos codificaban las proteínas fHBP de longitud completa a excepción de la secuencia señal de 19 aminoácidos amino-terminal y 7 restos N-terminales presumiblemente flexibles, e incluían un marcador de hexa-histidina (His6) C-terminal procedente del plásmido pET21b.

Se construyó la quimera I de fHBP carente de una secuencia señal mediante la amplificación por PCR de la región codificante de los restos 8-135 del ADN genómico de la cepa MC58 (v.1 de fHBP) y codificante de los restos 136-255 de la cepa 8047 (v.2). Se ensamblaron los dos fragmentos, incluyendo una región de solapamiento de 48 pares de bases en torno a los aminoácidos 136-139, mediante amplificación por PCR usando cebadores externos específicos de los genes que contenían los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*. El gen quimérico se clonó en pET21b como se ha descrito anteriormente para los genes de tipo silvestre.

Mutagénesis específica del sitio. Se usó la mutagénesis específica de sitio para ensayar las predicciones de los restos de aminoácidos implicados en los epítomos de mAb anti-fHBP y para crear la Quimera II. La mutagénesis se realizó usando el kit QuikChange II (Stratagene), usando 10 ng de molde de plásmido y los protocolos del fabricante. Para el ensayo de restos supuestamente implicados en los epítomos de mAb, las reacciones de mutagénesis se realizaron en plásmidos basados en pET21 que codificaban genes de fHBP de tipo silvestre de diversas cepas. Se cambió un resto de una secuencia reactiva por uno presente de forma natural en una secuencia no reactiva o vice versa. Para construir la Quimera II, se usó mutagénesis específica de sitio para introducir la sustitución A174K en el plásmido pET21 que codificaba la Quimera I. Los genes de fHBP mutante se confirmaron por secuenciación del ADN como se describe para los plásmidos de tipo silvestre anteriores.

Expresión y purificación de fHBP. Se expresaron fHBP de tipo silvestre, mutantes y quiméricas en BL21(DE3) de *Escherichia coli* (Novagen). Se realizaron purificaciones de fHBP a partir de cultivos de 1 litro. Se cultivaron cultivos de crecimiento exponencial medio (densidad óptica a 600 nm de 0,5-0,6) a 37 °C, se indujeron con isopropiltiogalactósido 0,5 mM durante 3-4 h y se cosecharon las bacterias por centrifugación. Se lisaron las células mediante incubación con lisozima de clara de huevo de pollo (Sigma) y dos ciclos de congelación/descongelación. Se trataron los lisados bacterianos con DNasa y RNasa (Sigma) e inhibidores de proteasa (exentos de EDTA Complete, Roche), y se aclararon por centrifugación a 13.000 xg. Las fHBP recombinantes se purificaron por cromatografía de quelato de níquel usando Ni-NTA agarosa (Qiagen) y los tampones recomendados por el proveedor. Se combinaron las fracciones que contenían fHBP purificada y se sometieron a diálisis frente a PBS (Roche) que contenía sacarosa al 5 % (p/v) y NaN₃ al 0,01 %, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4 °C.

Preparación de mAb. Se generaron líneas de células de hibridoma de bazo de ratones CD-1 inmunizados con el grupo de variante 2 de fHBP recombinante (gen de la cepa 2996) o grupo de variante 3 (gen de la cepa M1239) usando los métodos descritos anteriormente para la preparación de las líneas de células de hibridoma secretoras de anticuerpos monoclonales contra la proteína v.1 de fHBP (Welsch *et al.*, *J. Immunol.* 2004). Se hicieron precipitar los mAb en los sobrenadantes de cultivo tisular con solución saturada de (NH₄)₂SO₄ al 50 %, y se sometieron a diálisis frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS; Roche). Se determinaron los isotipos de IgG usando reactivos Clonotyping-AP (Southern Biotech).

ELISA de unión directa e inhibición. Se midió la unión de los mAb a fHBP recombinante mediante ELISA. Se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación (Immulon 2B; Thermo Electron Corp.) con 1 µg/ml de fHBP recombinante en PBS, y se incubaron durante la noche a 4 °C. Se bloquearon las placas con PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % (Sigma) (PBST) y BSA al 1 % (Sigma). Los anticuerpos primarios eran mAb anti-fHBP (0,016 a

5 µg/ml) y el anticuerpo secundario era fosfatasa alcalina de conejo anti-IgG de ratón (Zymed; 1:5000), cada uno diluido en PBST. Después de 1 h a temperatura ambiente, se añadió sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma) y se midió la absorbancia a 405 nm después de 30 min.

5 Para los ELISA de inhibición competitiva, se mantuvo un mAb a una concentración fija suficiente para obtener una DO a 405 nm de 1,0 determinada por ELISA de unión directa, como se ha descrito anteriormente. Se añadió un segundo mAb de un isotipo diferente junto con el primer mAb a los pocillos de una placa de microtitulación recubiertos con el antígeno como se ha descrito anteriormente, a concentraciones que variaban de 0,4 a 50 µg/ml. El mAb secundario era un conjugado de fosfatasa alcalina de ratón anti-IgG específico del isotipo. El ELISA se desarrolló como se ha descrito anteriormente.

15 *Inhibición de la unión del factor H.* Se midió la capacidad de un mAb anti-fHBP para inhibir la unión de fH a fHBP por ELISA. Se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación con fHBP como se ha descrito anteriormente. Se añadieron diluciones que contenían de 0,016 a 50 µg/ml del mAb a los pocillos junto con 50 µg/ml de fH purificado (Complement Technology, Inc.). Se incubaron las placas durante la noche a 4 °C. Se detectó el fH unido con anticuerpo policlonal de cabra anti-fH (Bethyl Laboratories) (1:1000), seguido de conjugado de ratón de fosfatasa alcalina-anti-IgG de cabra (Santa Cruz Biotech) (1:2000). Ambas etapas se realizaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después del lavado, se añadió sustrato y se procedió como se ha descrito anteriormente para el ELISA de unión de los anticuerpos.

20 *Transferencia Western.* Se cultivó un ml de cultivo bacteriano y se indujo como se ha descrito anteriormente (véase la expresión y purificación de fHBP anterior). Se recogieron las células por centrifugación y se volvieron a suspender en 0,5 ml de 1 x tampón de muestra LDS (Invitrogen) que contenía 2-ME 25 mM. Se separaron los lisados bacterianos por SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida NuPAGE al 4-12 % y tampón de SDS-PAGE MES (Invitrogen). Se transfirieron las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P; Millipore). Se bloquearon las membranas usando PBST que contenía leche descremada en polvo al 2 % (Carnation, Nestle, Inc.). Se lavaron las membranas, se incubaron con los diferentes mAb anti-fHBP (1 a 5 µg/ml) o, como control para la expresión de la proteína por los diferentes clones, 0,02 µg/ml de mAb Penta-His (Qiagen). Se lavaron las membranas en PBST y se incubaron con una dilución 1:10.000 de un conjugado de conejo de peroxidasa de rábano picante anti-IgG de ratón (Zymed) y se lavaron de nuevo. Se revelaron las membranas con un sustrato quimioluminiscente (ECL⁺, GE Healthcare) y visualizados en un generador de imágenes 840 (Molecular Dynamics).

35 *Inmunización de ratones.* Se inmunizaron grupos (5 ratones cada uno) de ratones CD-1 de cinco semanas de vida (Charles River) con cuatro dosis que contenían 20 µg de vacunas de fHBP quiméricas o de tipo silvestre, o adyuvante solo en intervalos de dos semanas. Cada vacuna experimental o de control se administró con hidróxido de aluminio o coadyuvante de Freund (FA) (FA completo por primera dosis y FA incompleto para las dosis posteriores).

40 *Actividad bactericida.* Se midió la actividad bactericida mediada por el complemento como se ha descrito previamente usando bacterias en fase logarítmica, lavadas, cultivadas en caldo de Mueller-Hinton suplementado con glucosa al 0,25 % y CMP-NANA 0,02 mM a una DO₆₂₀ de 0,6. El tampón era solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco de (Mediatech, Inc.) que contenía CaCl₂ 0,9 mM x 2 H₂O, MgCl₂ 0,5 mM x 6 H₂O y BSA al 1 % (p/v). La fuente del suplemento era suero humano de un adulto sano sin actividad bactericida intrínseca detectable. Para el sinergismo de la actividad bactericida de los mAb, se usaron cantidades iguales de dos mAb que variaban de 0,4 a 50 µg/ml (concentración final). La actividad bactericida (CB₅₀) del antisero del ratón (o combinación de mAb) se definió por la dilución (o concentración de mAb) que dio una reducción del 50 % en el número de UFC tras 60 min de incubación a 37 °C en comparación con las UFC en el punto temporal 0 de las reacciones de control negativo.

50 **VISIÓN DE CONJUNTO DE LOS EJEMPLOS**

En el presente estudio, se usó un grupo de doce anticuerpos monoclonales murinos (mAb) que se habían preparado contra las proteínas recombinantes representativas de los tres principales grupos de variantes de la proteína de unión al factor H (fHBP). Estos grupos de variantes se designan variante 1 (v.1; Welsch *et al J Immunol* 2004; 172:5606-15), variante 2 (v.2, Beernink *et al J Infect Dis* 2007; 195:1472-9) y v.3 (Beernink *et al, (2008) Infect Immun* 76:4232-4240). Como se ilustra mediante el resumen de las características seleccionadas de estos mAb en las tablas de las Figuras 17 y 18, cada uno de estos mAb es bactericida cuando se combina con un segundo mAb. Además, JAR 1 y JAR 3 son bactericidas individualmente, según lo ensayado contra ciertas cepas que expresan v.1 de fHBP.

60 Los resultados resumidos en la Figura 18 prueban que los epítomos reconocidos por cada uno de los mAb están expuestos en la superficie en cepas meningocócicas encapsuladas y son capaces de interactuar con anticuerpos protectores.

65 Nueve de estos mAb JAR se usaron como herramientas para determinar restos de aminoácidos de fHBP que contribuyen a los epítomos para la unión de estos mAb con el fin de proporcionar las predicciones estructurales sobre

las ubicaciones de los epítomos de fHBP de diferentes grupos de variantes que interactúan con anticuerpos bactericidas. Entonces, dicha información se podría usar para construir vacunas de fHBP quiméricas que expresan epítomos de más de un grupo de variantes y que son capaces de generar anticuerpos que confieren protección contra cepas que expresan diferentes variantes de fHBP.

5 Para mayor comodidad a la hora de facilitar los estudios previos destinados a la identificación de regiones bactericidas de fHBP, la proteína se dividió en tres dominios, designados A, B y C (Giuliani *et al.*, *Infect Immun* 2005; 73: 1151-60). Como se ha tratado anteriormente, el dominio A está altamente conservado entre los grupos de las variantes v.1 y v.2, mientras que los dominios B y C contienen secuencias que divergen entre las cepas. Anteriormente, el único epítomo de fHBP conocido que interactuaba con un mAb bactericida se encontraba en el dominio C en R204 (Giuliani *et al. Supra*). (Cabe señalar que, en el presente documento, se adopta la convención de la numeración de los restos de aminoácidos que comienza con el primer resto detrás de la secuencia señal). Sin embargo, una vacuna de proteína quimérica compuesta del dominio B de una cepa de la variante 3 (B₃) fusionado con el dominio C de una cepa de la variante 1 (C₁) no generó respuestas bactericidas de protección contra las cepas bien con la variante 1 o 3 de fHBP.

20 Como se expone con más detalle a continuación, los inventores identificaron la localización de un epítomo definido por dos mAb anti-fHBP, JAR 3 y 5 (denominado en el presente documento epítomo "JAR3/5"), en el dominio B₁ entorno al resto G121. JAR 3 se conocía individualmente como bactericida con complemento humano frente a las cepas del complejo 32 de tipo secuencia (ST) (Welsch *et al J Immunol* 2004; 172: 5606-15), y tanto JAR 3 como JAR 5 cuando se combinaron con otros anticuerpos monoclonales fueron ampliamente bactericidas contra las cepas que expresaban subvariantes de la variante 1 de fHBP (Welsch *et al., supra*). JAR 3 (Madico *et al J Immunol* 2006; 177:501-10) y JAR 5 también inhibieron la unión del factor H (fH) a la superficie de cepas de *N. meningitidis* encapsuladas. Cabe señalar que, a excepción de JAR3/5, el resto de mAb mapeados hasta la fecha resultaron unirse a epítomos que forman parte del dominio C.

30 Las observaciones relativas a la presencia del epítomo JAR 3/5 en el dominio B sirvieron de fundamento para la fusión de la parte de la proteína de dominio B de v.1 que contenía el epítomo JAR3/5 (por ejemplo, hasta el resto 136) con la parte restante del dominio B y el dominio C completo de la proteína v.2 (Quimera I). La inclusión del epítomo JAR 3/5 de la v.1 en los restos cercanos y que incluían G121 generó anticuerpos ampliamente protectores contra cepas de subvariantes de v.1 y de v.1.

35 Además, mediante la inclusión de los otros epítomos, tales como JAR 10, 11 y 13, la fHBP quimérica proporcionó un polipéptido que generó anticuerpos ampliamente protectores contra cepas de v.2 o v.3. Cuando los ratones fueron inmunizados con vacunas bien de Quimera I o de Quimera II, los animales desarrollaron respuestas de anticuerpos bactericidas séricos contra cepas que expresaban la v.1, la v.2 o la v.3 de fHBP, mientras que, como era de esperar, las respuestas de anticuerpos bactericidas séricos de los ratones de control inmunizados con la v.1 de fHBP recombinante de tipo silvestre se restringieron casi totalmente a las cepas que expresaban la v.1 de fHBP, y las de los ratones de control inmunizados con la v.2 de fHBP recombinante de tipo silvestre se limitaron a v.2 o v.3 (que, según estudios anteriores, se sabe que reaccionan de forma cruzada (Massignani 2007 *J Exp Med, supra* y Beernink 2007 *J. Infect Dis supra*). Los resultados proporcionan una prueba de concepto de que una proteína quimérica individual puede generar anticuerpos que son bactericidas con complemento humano frente a cepas que expresan la fHBP de diferentes grupos de variantes.

45 Por lo tanto, en contraste con la B₃C₁ quimérica anteriormente publicada, una vacuna de proteína quimérica compuesta por el dominio A₁ (que está altamente conservada en la variante 1 y 2), la parte N-terminal del dominio B₁ que expresa el epítomo JAR 3/5 fusionado con la parte terminal distal del dominio B₁ y el dominio C₁ generó anticuerpos bactericidas con protección cruzada en ratones inmunizados.

50 El epítomo JAR 11 se expresa en aproximadamente un tercio de las cepas de *N. meningitidis* productoras de enfermedades en EE.UU. que expresan v.2 o v.3 de fHBP (Beernink 2007 *J. Infect Dis, supra*). Aproximadamente el 50 por ciento de las cepas negativas en JAR 11 con v.2 o v.3 de fHBP expresan el epítomo JAR 32/35. Por lo tanto, para aumentar la cobertura contra estas cepas, se preparó la vacuna de Quimera II, en la que se introdujo un cambio de aminoácido, A174K, en el dominio C que inactivó el epítomo reconocido por JAR 11 e introdujo el epítomo reconocido por JAR 32/35. A pesar de la expresión de ingeniería genética del epítomo JAR 11 de la Quimera I y el epítomo JAR 32 de la Quimera II, no hubo diferencias estadísticamente significativas en las respectivas respuestas de anticuerpos bactericidas séricos de ratones inmunizados con cualquier vacuna contra las cepas que expresaban la v.2 o v.3 de fHBP que eran positivas en JAR 11 o positivas en JAR 32.

60 Como se establece a continuación, más tarde se descubrió que la unión del anticuerpo a un epítomo situado cerca del resto 174 (es decir, JAR 11 en algunas cepas, y JAR 32 en otras; véase la Figura 1) no bastaba para generar actividad bactericida mediada por complemento significativa en ausencia de un segundo mAb que se uniera a un epítomo asociado con un par iónico en los restos 180 y 192 (tal como JAR 10 en algunas cepas o JAR 33 en otras (véase la tabla de la Fig. 20)). Entre las cepas de tipo silvestre que expresan v.2 o v.3 de fHBP, la expresión de JAR 32 se suele asociar con la expresión de JAR 33 (por ejemplo, las cepas 03S-0658, M1239 y SK104, tabla de la Figura 8A), mientras que la expresión de JAR 11 normalmente se asocia con la expresión de JAR 10 (véase, por

ejemplo, las presentes cepas 8047, MD1435 y MD1321, Figura 8A). Dicha visión se refería a la producción de vacunas de fHBP quiméricas eficaces contra las cepas positivas en JAR 32 introduciendo también el epítipo JAR 33.

- 5 Además, como se expone a continuación, se descubrió que la actividad bactericida de los anticuerpos es mayor cuando dos anticuerpos se unen a sus respectivos epítopos situados a una distancia de aproximadamente 18 a 20 Å. Dicho de otra manera, se observó un mayor efecto bactericida cuando dos anticuerpos se unieron a epítopos situados a aproximadamente 18-20 Å en la fHBP quimérica en comparación con el efecto bactericida de estos anticuerpos solos. Por el contrario, la unión de dos anticuerpos a epítopos situados a una distancia mayor (por ejemplo, ≥ 27 Å) no mejoró la actividad bactericida, lo que se puede deber a la reducción de la capacidad de estos anticuerpos unidos para proporcionar una mejor interacción con C1q de la cascada del complemento. La unión de dos anticuerpos a epítopos situados a ≤ 14 Å tampoco proporcionó una mejor actividad bactericida, lo que se puede deber a un impedimento estérico de la unión de un anticuerpo por el otro. Por lo tanto, las fHBP quiméricas que contienen epítopos que generan anticuerpos que se unen a epítopos a una distancia de aproximadamente 18-20 Å pueden proporcionar una producción de anticuerpos bactericidas todavía mejor. Los ejemplos de dichos pares de epítopos son aquellos epítopos unidos por JAR 10 y JAR 11; y por JAR 33 y JAR 32/35 (JAR 32 y JAR 35 se unen a los mismos epítopos (o superpuestos)).

20 El efecto de los polipéptidos fHBP quiméricos como vacunas se puede mejorar aún más mediante la inclusión de epítopos que generan anticuerpos que bloquean la unión al fH. Por ejemplo, como se indica a continuación, cuando los epítopos unidos por JAR 13 (epítipo v.2), JAR 11 (epítipo v.2) y JAR 32/35 (epítipo v.3) son unidos por el anticuerpo, se inhibe la unión de fHBP al fH. Por lo tanto, la presencia de dichos epítopos de unión al fH en los polipéptidos fHBP quiméricos puede proporcionar la producción de anticuerpos que pueden facilitar protección a través de esta vía.

25

A continuación, se exponen los detalles de los estudios que condujeron a dicho descubrimiento.

EJEMPLO 1: IDENTIFICACIÓN DE RESTOS DE AMINOÁCIDOS DE EPÍTOPOS DE FHBP IMPORTANTES PARA LA UNIÓN DE MAB JAR 3/5

30

En las tablas de las Figuras 17 y 18, se resumen las propiedades conocidas seleccionadas de los mAb JAR. En particular, se sabe que JAR 3 y JAR 5 se unen a v.1 o subvariantes de v.1 de fHBP expresadas por las cepas MC58, 4243, M1390 y NZ98/254, pero no a la cepa M6190 (Welsch *et al J Immunol* 2004; 172:5606-15). Además, fHBP expresada por M6190 tenía una arginina en la posición 121 (R121), mientras que las fHBP de las cuatro cepas reactivas tenían glicina en la posición 121 (G121) (Welsch *et al J Immunol* 2004; 172:5606-15).

35

Para confirmar que G121 era importante para la unión de JAR 3 y JAR 5, se usó la mutagénesis dirigida para cambiar el resto de glicina de la posición 121 de la secuencia de fHBP de la cepa MC58 por arginina.

40

Como se ilustra en las transferencias Western de la Figura 1, la sustitución G121R se tradujo en la pérdida de la reactividad de JAR 3 y JAR 5 (Figura 1, Grupo A). El cambio inverso en fHBP de la cepa M6190, R121G, introdujo el epítipo JAR 5 (Figura 1, Grupo A, carril 6) y, en menor medida, el epítipo JAR 3 (Figura 1, Grupo B, carril 6). Las señales más débiles para la proteína R140G mutante de M6190, en particular, para JAR 3, indicaron que los restos adicionales pueden haber sido importantes para estos epítopos. El mAb de control Penta-His mostró que las proteínas de tipo silvestre y mutantes se produjeron en cantidades similares (Figura 1, Grupo C).

45

La evidencia adicional de que JAR 3 y JAR 5 reconocieron epítopos superpuestos se derivó de experimentos de inhibición competitiva.

50

Los resultados se muestran en la Figura 2. JAR 5 (5 μ g/ml) inhibió la unión de JAR 3 en más de un 90 % (Figura 2, Grupo A) y la reacción recíproca con JAR 3 inhibió la unión de JAR 5 (Figura 2, Grupo B). Por el contrario, no hubo inhibición detectable de la unión de JAR 4 por JAR 3 (50 μ g/ml) ni JAR 5 (50 μ g/ml) (Figura 2C). JAR 4 tampoco inhibió la unión de JAR 3 (Figura 2, Grupo A) ni JAR 5 (Figura 2, Grupo B). El control positivo, una dilución 1:10 de antisuero de conejo anti-v.1 de fHBP, inhibió la unión de los tres mAb, mientras que el suero de conejo preinmune y los mAb de control negativo dieron menos del 7 % de inhibición. Por lo tanto, JAR 3 y JAR 5 reconocen los epítopos superpuestos (o idénticos), ya que cada uno de estos mAb inhibió la unión del otro a fHBP.

55

EJEMPLO 2: IDENTIFICACIÓN DE RESTOS DE AMINOÁCIDOS DE EPÍTOPOS DE FHBP IMPLICADOS EN LA UNIÓN DE MAB JAR

60

Para investigar los epítopos definidos por el resto de mAb anti-fHBP del grupo, se usó mutagénesis específica de sitio para crear anulaciones (KO) de las fHBP recombinantes. Para nueve de los mAb, una fHBP KO carente del resto indicado generó una pérdida significativa de la unión del correspondiente mAb JAR medida por transferencia Western y/o ELISA (véase la tabla de la Figura 29). Para siete de los mAb, se demostró que el respectivo mAb que era negativo para la unión se volvió positivo para la unión tras la introducción de una o dos de las sustituciones de aminoácidos correspondientes (véase la tabla de la Figura 29). Tomadas en conjunto, una o ambas estrategias

65

sirvieron para identificar correctamente los restos de aminoácidos implicados en la reactividad de nueve de los mAb JAR (Figura 3).

5 Las Figuras 30-32 proporcionan datos de apoyo para la identificación de los restos que participan en la unión de los mAb JAR. Se analizaron los lisados de *E. coli* que contenían plásmidos que expresaban las respectivas fHBP de tipo silvestre y mutantes por transferencia Western usando el mAb JAR apropiado, así como un anticuerpo de control para detectar un marcador epitópico presente en la fHBP (penta-His).

10 En concreto, la Figura 30 es una transferencia Western que indica los restos que participan en los epítomos JAR 10 y JAR 33, en la que los lisados de *E. coli* que contienen plásmidos que expresan las respectivas fHBP mutantes y de tipo silvestre se analizaron mediante transferencia Western con JAR 10 (Grupo A) o mAb Penta-His (Grupo B). La Figura 31 es una transferencia Western que indica un resto implicado en los epítomos JAR 11, JAR 32 y JAR 35, en la que lisados de *E. coli* que contienen plásmidos que expresan las respectivas fHBP mutantes y de tipo silvestre se analizaron mediante transferencia Western con JAR 32 (Grupo A), JAR 35 (Grupo B), JAR 11 (Grupo C) o mAb Penta-His (Grupo D). La Figura 32 es una transferencia Western que indica el resto implicado en el epítomo JAR 13, en la que lisados de *E. coli* que contiene plásmidos que expresan las respectivas fHBP mutantes y de tipo silvestre se sondaron con JAR 13 (Grupo A) o mAb Penta-His (Grupo B) y anticuerpo secundario de HRP anti-IgG de ratón.

20 Se ha de señalar que la numeración de los restos de aminoácidos usados en el presente documento se hace con referencia a la secuencia de proteína madura (es decir, que carece de la señal) de fHBP de la cepa MC58 (es decir, se usó la secuencia de aminoácidos de fHBP de MC58 como la secuencia de aminoácidos de v.1 de fHBP de referencia). Dado que el número total de restos de aminoácidos de v.2 y/o v.3 de fHBP difiere del número total de restos de aminoácidos de las v.1 de fHBP, las secuencias de aminoácidos de la proteína v.2 (usando fHBP de la cepa 8047 como la secuencia de aminoácidos de v.2 de referencia) y la v.3 de fHBP (usando la fHBP de la cepa M1239 como la secuencia de aminoácidos de v.3 de referencia) difieren en -1 y +7 restos de aminoácidos, respectivamente, de la de MC58. Así pues, por ejemplo, un resto de leucina (L) situado, según el sistema de numeración del presente documento, en la posición 166 de la secuencia de v.2 o la v.3 de fHBP, en realidad, se encuentra en la posición 165 de la proteína v.2 y en la posición 173 de la proteína v.3 basándose en la secuencia de aminoácidos real de estas proteínas, y no según la numeración usada en el presente documento basada en la alineación de estas secuencias con la v.1 de fHBP de MC58.

35 Además, se investigó el papel de los epítomos de mAb JAR en la unión a fH por fHBP. La Figura 19 es una serie de gráficas que muestran la capacidad de los mAb JAR representativos preparados contra las proteínas recombinantes v.2 (8047), v.3 (M1239) o v.1 (MC58) de fHBP para dar la inhibición dependiente de la concentración de la unión de fH a v.2 de fHBP (Grupo A), v.3 de fHBP (Grupo B), o v.1 de fHBP (Grupo C) en un ELISA. Estos datos muestran que algunos de los restos de contacto definidos por los epítomos de mAb JAR están implicados en la unión a fH. Por lo tanto, estos datos argumentan la posible inclusión o preservación de epítomos de mAb JAR que participan en la unión a fH, pues el bloqueo de la unión de fH a *N. meningitidis* puede proporcionar un mecanismo adicional de protección.

40

EJEMPLO 3: PRODUCCIÓN DE FHBP QUIMÉRICAS QUE CONTIENEN EPÍTOPOS V.1 Y V.2

45 Como se ha señalado anteriormente, los epítomos definidos por JAR 3 y JAR 5, están situados dentro del dominio B de la variante 1 de fHBP, comenzando aproximadamente 19 restos de aminoácidos N-terminales con respecto al inicio de la hélice α AH2, o aproximadamente 15 restos de aminoácidos N-terminales con respecto a la secuencia de aminoácidos de GEHT. Se construyó una primera fHBP quimérica (denominada en el presente documento "Quimera I") mediante la combinación de una parte del gen que codifica el dominio A y la parte N-terminal del dominio B hasta el resto G136 de v.1 de fHBP de MC58 con la parte distal del gen que codifica la hélice α del dominio B y el dominio C de de la v.2 de fHBP de la cepa 8047. Se usó el resto de la posición G136 como una posición de cruce conveniente (el punto en el que la secuencia quimérica "cambió" del de la v.1 de fHBP al de la v.2 de fHBP). G136 es N-terminal de la hélice α AH2 y comienza una secuencia de cuatro restos altamente conservados, GEHT, que se muestran en un recuadro en la Figura 4. Los corchetes exteriores muestran la región de la proteína definida previamente como el dominio B (Giuliani *et al Infect Immun* 2005; 73:1151-60).

55 Se generó una segunda fHBP quimérica, denominada en el presente documento Quimera II. La Quimera II era idéntica en la secuencia de aminoácidos a la Quimera I, a excepción de la introducción de la sustitución A174K (K en negrita y subrayada, Quimera II, Figura 4). Cabe señalar que el dominio A no se muestra en la Figura 4 ni en la estructura basada en RMN de la Figura 5, pero estaría unida al extremo N marcado con "N" en la Figura 5.

60 En la Figura 5, se muestran modelos de las dos vacunas de quimera, Grupos A y B. La Quimera I contiene el epítomo JAR 11, incluyendo el resto A174 (Figura 5, Grupo A). La Quimera II contiene los epítomos JAR 32 y JAR 35, incluyendo el resto K174 (Figura 5, Grupo B). El modelo de las quimeras fHBP se construyó basándose en la estructura de RMN de Cantini *et al. J Biol Chem* 2006; 281: 7220-7.

EJEMPLO 4: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS MUTANTES

- Se expresaron proteínas recombinantes en *E. coli* como fusiones de hexahistidina (His₆) C-terminales, que se purificaron por cromatografía de quelatos metálicos. En concreto, las proteínas se expresaron a partir de plásmidos basados en pET21 en BL21(DE3) de *E. coli* como fusiones de hexahistidina C-terminales. Las proteínas de fusión se aislaron por cromatografía de quelato de metal de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las proteínas aisladas se sometieron a diálisis frente a 1 x PBS, sacarosa al 5 % y DTT 1 mM, y se esterilizaron por filtración. Las proteínas (5 µg cada uno) se separaron en un gel de poliacrilamida al 4-12 % y se tiñeron con azul de Coomassie.
- Los resultados se muestran en la Figura 6. Carril 1, patrón de masa; 2, v.1 de fHBP (MC58); 3, v.2 de fHBP (8047); 4, Quimera I de fHBP; 5, Quimera II de fHBP.

EJEMPLO 5: EXPRESIÓN DE EPÍTOPOS POR PARTE DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

- Se usó un ELISA para evaluar la unión dependiente de la concentración de los anticuerpos mAb anti-fHBP a los antígenos quiméricos aislados del Ejemplo 4. Como era de esperar, JAR 1, que se une a un epítipo v.1 en el dominio C (R204), no se unió a ninguna de las proteínas quiméricas (Fig. 7, Grupo A). JAR 5, que es específico de un epítipo del dominio B de v.1 de fHBP, y JAR 4, que reacciona de forma cruzada con un epítipo que todavía no está definido expresado por v.1 y v.2, mostraron una unión dependiente de la concentración idéntica respectiva con las dos proteínas quiméricas en comparación con las respectivas proteínas v.1 y/o v.2 de tipo silvestre.

- La Figura 7, Grupo B, proporciona los datos de unión de los mAb JAR 10, 11 y 13, procedentes de un ratón inmunizado con v.2 de fHBP. Los tres mAb reconocen los epítopos del dominio C de v.2 de fHBP de la cepa 8047 (Figura 20), y mostraron unión dependiente de la concentración respectiva similar con la proteína Quimera I a la que mostraron con la proteína de control v.2 de rfHBP de tipo silvestre expresada a partir del gen de la cepa 8047 (Fig. 7, Grupo B). Como era de esperar, JAR 11 no se unió a la Quimera II, ya que esta proteína tenía la lisina sustituida con alanina en la posición 174 (A174K), lo que eliminó el epítipo JAR 11 e introdujo el epítipo JAR 32 (Grupo C). JAR 36, que reacciona de forma cruzada con un epítipo aún no definido, pero presente en v.2 de fHBP y v.3 de fHBP se unió a ambas proteínas quiméricas y al control de v.2 de rfHBP de tipo silvestre, pero no al control de v.1 de fHBP (Fig. 7, Grupo C). En conjunto, los datos mostraron que las dos fHBP quiméricas expresaron epítopos asociados con las proteínas v.1, v.2 y/o v.3 de fHBP, y reaccionaron, como era de esperar, con los diversos mAb de acuerdo con los presentes estudios de la localización de los epítopos.

EJEMPLO 6: INMUNIZACIÓN DE RATONES CON FHBP MUTANTES Y QUIMÉRICAS DOBLES Y RESPUESTAS DE ANTICUERPOS BACTERICIDAS

- Se usaron las proteínas que se muestran en la Figura 6 para inmunizar ratones de acuerdo con el programa de la Tabla 1 que figura a continuación. Se administraron cuatro dosis de la vacuna (20 µg de proteína) IP con intervalos de 2 semanas entre las dosis. Se sangraron los ratones 2,5 semanas después de dosis 4. CFA = adyuvante completo de Freund; IFA = adyuvante incompleto de Freund; Al(OH)₃ = hidróxido de aluminio. A continuación, CFA/IFA indica que los ratones recibieron una dosis inicial con CFA, y a continuación, las dosis de refuerzo posteriores con IFA. Cuando se usó Al(OH)₃ como adyuvante, todas las dosis se administraron con hidróxido de aluminio como adyuvante.

45

Tabla 1. Programa de inmunización¹

Grupo	Proteína fHBP	Adyuvante
1	—	CFA/IFA
2	v.1 de fHBP	CFA/IFA
3	v.2 de fHBP	CFA/IFA
4	Quimera I	CFA/IFA
5	Quimera II	CFA/IFA
6	---	Al(OH) ₃
7	v.1 de fHBP	Al(OH) ₃
8	v.2 de fHBP	Al(OH) ₃
9	Quimera I	Al(OH) ₃
10	Quimera II	Al(OH) ₃

¹Los Grupos 1 a 10 consisten en 5 ratones CD-1 en cada uno (N = 60). Cada animal recibió cuatro inyecciones.

- La figura 9 resume las respuestas de los anticuerpos en suero de los ratones que recibieron las vacunas quiméricas administradas con FA medidas contra la cepa H44/76 (variante 1) y cuatro cepas adicionales que expresan subvariantes de v.1 de fHBP (es decir, proteínas fHBP con relativamente pocas diferencias de aminoácidos (por

ejemplo, con más del aproximadamente 88 % y menos del 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos) entre la secuencia de la respectiva proteína y la de v.1 de fHBP de H44/76). Los ratones inmunizados con la proteína de control v.1 de rfHBP de tipo silvestre tuvieron altas respuestas a H44/76 (GMT recíproco de casi 10.000) y respuestas más bajas y variables contra las otras cuatro cepas de ensayo (que varían desde un GMT de < 1:10
 5 contra la cepa NZ98/254 a un GMT de > 1:1.000 en contra SK084). Los sueros de los ratones inmunizados con la proteína de control v.2 de rfHBP fueron bien negativos para la actividad bactericida (títulos bactericidas < 1:10, cuatro cepas) o débilmente positivos (GMT recíproco de 1:10; cepa SK141). Los ratones inmunizados con vacuna de cualquier proteína quimérica desarrollaron anticuerpos bactericidas séricos contra las cuatro cepas que eran susceptibles a la actividad bactericida de los sueros de los ratones de control inmunizados con la v.1 de rfHBP. Para
 10 tres de las cuatro cepas, los respectivos GMT recíprocos de los grupos de vacuna quiméricas fueron ~ 1 log inferiores a los de los ratones que recibieron la vacuna v.1 de rfHBP de control, mientras que las respuestas a la quinta cepa, SK141, fueron tan altas o más altas que las de los ratones que recibieron la vacuna de v.1 de rfHBP de control.

15 La Figura 10 resume las respuestas de anticuerpos bactericidas séricos medidas frente a las seis cepas que expresan las fHBP en los grupos de variantes v.2 o v.3. Tres de las cepas fueron positivas en JAR 11 (grupo de la izquierda) y tres fueron positivas en JAR 32 (grupo de la derecha). Los sueros de los ratones de control inmunizados con v.2 de rfHBP fueron bactericidas contra todas las seis cepas mientras que, con una excepción (cepa 03S-0658), los títulos bactericidas en suero de los ratones de control inmunizados con v.1 de rfHBP fueron < 1:10. Los sueros
 20 de los ratones inmunizados con cualquiera de las vacunas quiméricas fueron bactericidas contra las seis cepas. Para cuatro de las cepas (8047, MD1321, M1239 y SK104), los respectivos títulos fueron ~ 1 log inferiores a los de los ratones de control inmunizados con v.2 de rfHBP. Para las dos cepas restantes, 03S-0658 y MD1435) Los títulos generados por una o ambas vacunas quiméricas fueron similares a los de los ratones que recibieron la vacuna de v.2 de rfHBP de control positivo. Por lo tanto, en contraste con las vacunas de v.1 o v.2 de rfHBP de control, las
 25 vacunas quiméricas provocaron respuestas de anticuerpos bactericidas contra las cepas que expresaban fHBP de cada uno de los tres grupos de variantes antigénicas.

La vacuna de Quimera I expresó el epítipo JAR 11, mientras que la vacuna de Quimera II expresó el epítipo JAR 32 (Fig. 1). Sin embargo, con una excepción, las respectivas respuestas de los ratones inmunizados con cualquiera
 30 de las vacunas quiméricas cuando se midieron frente a cepas que expresaban fHBP positiva en JAR 11 o en JAR 32 no fueron significativamente diferentes entre sí (Fig. 5). La excepción fue la cepa positiva en JAR 11 MD1435, en la que hubo una tendencia a un mayor GMT recíproco en el grupo de ratones inmunizados con la Quimera I que con la Quimera II (P = 0,06).

35 Por lo tanto, la sustitución A174K en la Quimera II, que eliminó el epítipo JAR 11 (v.2) e introdujo el epítipo JAR 32/35 (v.3), no aumentó apreciablemente las respuestas bactericidas contra una cepa de ensayo que expresaba la proteína v.3.

La Figura 11 resume las respuestas de anticuerpos bactericidas séricos de ratones inmunizados con las vacunas quiméricas cuando se absorbieron con hidróxido de aluminio como medida contra el grupo de cepas de ensayo con
 40 v.1 de fHBP. En la Figura 12, se muestran los datos correspondientes a las respuestas generadas hacia las cepas de ensayo que expresan la v.2 o la v.3 de fHBP. En general, las respectivas respuestas a las diferentes vacunas absorbidas con hidróxido de aluminio fueron paralelas a las observadas para las vacunas administradas con adyuvante de Freund, aunque, como era de esperar, los títulos fueron algo inferiores con el adyuvante de hidróxido
 45 de aluminio.

Los datos anteriores indican que el epítipo JAR3/5, que es común a casi todas las proteínas v.1, pero que no está presente en fHBP de las cepas v.2 o v.3, es importante para generar altos títulos de anticuerpos bactericidas hacia la proteína v.1 de fHBP. Dicho descubrimiento de que el epítipo reconocido por JAR 3/5 desempeña un papel
 50 importante en la generación de anticuerpos bactericidas v.1 de fHBP proporciona la base para el diseño racional de vacunas de fHBP quiméricas adicionales que pueden generar anticuerpos bactericidas contra las cepas que expresan diferentes variantes de la proteína fHBP, en particular, contra cepas que expresan tanto v.1 como v.2 de fHBP. Por ejemplo, las dos vacunas quiméricas descritas anteriormente (Quimera I y Quimera II) incluían, desde el extremo N hasta el extremo C:

- 55 1) un dominio A (común tanto a v.1 como a v.2);
- 2) un dominio B heterólogo compuesto de, desde el extremo N hasta el extremo C,
 - 60 a) una secuencia de aminoácidos contigua de una parte N-terminal de un dominio B de una v.1 de fHBP que contenía la secuencia de aminoácidos que define el epítipo JAR 3/5, unida operativamente a
 - b) una secuencia de aminoácidos contigua que define el resto del dominio B, secuencia de aminoácidos que es la de un dominio B de una v.2 de fHBP, donde la secuencia de aminoácidos de v.2 de fHBP está presente en el dominio B heterólogo después de la secuencia de aminoácidos de GEHT; y
- 65 3) un dominio C de la proteína v.2.

EJEMPLO 8: POLIMORFISMOS NATURALES O SINTÉTICOS DE LOS DOMINIOS B DE V.1 DE FHBP

Como se ha indicado anteriormente, el descubrimiento del epítipo JAR 3/5 en la parte N-terminal de v.1 de fHBP proporciona la base para la construcción de polipéptidos fHBP quiméricos adicionales que pueden servir como vacunas para generar anticuerpos bactericidas con reactividad cruzada contra las cepas de *N. meningitidis* que expresan v.1 de fHBP y las cepas de *N. meningitidis* que expresan v.2 de fHBP. Para orientar en cuanto a las secuencias de aminoácidos de v.1 de fHBP que encuentran su uso en las vacunas de fHBP quiméricas contempladas en el presente documento, se analizaron diversas secuencias de aminoácidos de v.1 de fHBP del dominio B.

La Figura 13 proporciona una alineación de secuencias de v.1 de fHBP con polimorfismos naturales en la parte N-terminal del dominio B. La conservación de la secuencia se muestra debajo de la alineación, indicando el "*" los restos que son idénticos; indicando ":" los restos que están conservados; y "." Indicando los restos que están semiconservados a través de las secuencias alineadas. Las posiciones de las hélices α se muestran encima de la alineación, estando los restos implicados en las hélices α indicados en cursiva. El resto G121, que está implicado en el epítipo JAR 3 y JAR 5, se muestra en negrita y subrayado. También aparece una lisina en la posición 122 (K122) que es importante en el epítipo JAR 3/5, ya que una cepa que es negativa en la unión de JAR 3 y JAR 5, 03S-0408, tiene G121 pero difiere de las cepas reactivas con JAR 3/5 en que tiene serina en la posición 122 (S122) (datos no mostrados). La secuencia de aminoácidos de GEHT que proporciona el punto en el que la secuencia del dominio B de la quimera "cambia" o "cruza" a la secuencia de aminoácidos de un dominio B de v.2 de la Quimera I y Quimera II (denominado en el presente documento "punto de unión") se muestra en el recuadro.

Como se muestra en la Figura 13, hay una serie de polimorfismos naturales en la región de G121 que está implicado en el epítipo JAR 3/JAR 5. En concreto, una fHBP que contiene R121 (en lugar de G121) no expresa el epítipo JAR 3/JAR 5. Sin embargo, los polimorfismos cercanos a G121, por ejemplo, P117 en NZ98/254 y D121 en 4243, no interfieren con la unión de JAR 3 ni JAR 5. Por lo tanto, algunas modificaciones en restos distintos de G121 proporcionan la expresión del epítipo JAR 3/5.

Así pues, la alineación proporciona orientación en cuanto a los tipos de sustituciones de aminoácidos que se pueden introducir a la vez que se mantiene la expresión del epítipo JAR 3/5. Dichas sustituciones de aminoácidos pueden ser bien de origen natural (es decir, polimorfismos naturales) o se pueden introducir por medios sintéticos (por ejemplo, polimorfismos recombinantes). Por lo tanto, los dominios B heterólogos de los polipéptidos fHBP quiméricos contemplados en el presente documento incluyen aquellos que contienen secuencias de dominio B de v.1 con polimorfismos naturales y sintéticos en el dominio B proximal, incluyendo variantes tanto naturales como sintéticas.

EJEMPLO 9: POLIMORFISMO NATURAL O SINTÉTICO DE DOMINIOS C DE FHBP

Además del epítipo JAR 3/5, las fHBP quiméricas contempladas en el presente documento generalmente incluyen uno o más epítopos de los dominios B y C de v.2 de fHBP, estando los epítopos del dominio B de v.2 de fHBP presentes en un lugar C-terminal (es decir, distal) con respecto a la ubicación del epítipo JAR 3/5 de las v.1 de fHBP, que generalmente es C-terminal a la hélice α que sigue a la secuencia de GEHT, que está compartida entre las v.1 y v.2 de fHBP. Para orientar en cuanto a las secuencias de aminoácidos de la v.2 de fHBP que encuentran uso en las vacunas de fHBP quiméricas contempladas en el presente documento, se analizaron diversas secuencias de aminoácidos del dominio B de v.2 de fHBP, así como el dominio C.

La Figura 14 proporciona una alineación de secuencias de v.2 de fHBP ilustrativas de la parte distal del dominio B, y proporciona, además, secuencias de v.2 de fHBP ilustrativas del dominio C, en las que el dominio B se define generalmente como los restos 101-164, con la numeración basada en la fHBP de MC58 como referencia.

Por lo tanto, basándose en las variantes polimórficas mostradas en las Figuras 13 y 14, se pueden prever fácilmente las variaciones en la secuencia de aminoácidos de los dominios B y dominios C de v.2 de fHBP, así como combinaciones adicionales de los dominios B heterólogos de v.1/v.2 con diferente dominios C de v.2 para generar fHBP quiméricas adicionales. Las Figuras 13 y 14 proporcionan 7 secuencias de aminoácidos ilustrativas de la región N-terminal del dominio B de v.1 (Figura 10) y 9 secuencias de aminoácidos ilustrativas para la parte distal del dominio B de v.2 de fHBP y para el dominio C de v.2 de fHBP (Figura 11). Por lo tanto, las secuencias de las Figuras 13 y 14 proporcionan al menos 63 quimeras de fHBP diferentes, simplemente mediante la combinación de las secuencias de aminoácidos según lo previsto. Además, las alineaciones proporcionan orientación en cuanto a los restos de aminoácidos que se pueden sustituir.

Así pues, no solo estas secuencias ilustrativas proporcionan una guía para el uso de secuencias de aminoácidos que contienen polimorfismos naturales, sino que también proporcionan una guía para la producción de variantes generadas sintéticamente (por ejemplo, usando métodos recombinantes). Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones puntuales adicionales en el ácido nucleico codificante para proporcionar quimeras de fHBP que expresen otros epítopos deseables tales como el epítipo de v.1 reconocido por JAR 1/mAb 502, que está en la parte del dominio C (R204), o el epítipo JAR 11 de las Quimeras IV y V. La introducción del epítipo JAR1/mAb 502 puede ofrecer mejor reactividad cruzada contra cepas de v.1 del linaje ST-32 que casi siempre expresan el epítipo JAR 1,

mientras que la generación de anticuerpos contra el epítipo JAR 11 puede proporcionar mejores títulos contra cepas de v.2 (véase Koeberling *et al*, *J Infect Dis* 2008, 198:262-270, para una descripción de v.1.1).

5 También cabe señalar que, a pesar de la expresión por ingeniería genética del epítipo JAR 11 en la Quimera I y el epítipo JAR 32 en la Quimera II, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las respectivas respuestas de anticuerpos bactericidas séricos de los ratones inmunizados con cualquier vacuna contra las cepas que expresan la v.2 o la v.3 de fHBP que eran positivas en JAR 11 o positivas en JAR 32. Sin embargo, el descubrimiento de que la unión del anticuerpo a un epítipo situado cerca del resto 174 (es decir, JAR 11 en algunas cepas, y JAR 32 en otras; véase la Figura 3) no bastó para generar actividad bactericida mediada por el complemento en ausencia de la generación de anticuerpos adicionales que se unieran a un segundo epítipo asociado con un par iónico en los restos 180 y 192 (tales como JAR 10 en algunas cepas o JAR 33 en otras (tabla de la Figura 20) indica que es posible mejorar la cobertura contra las cepas positivas en JAR 32 mediante la expresión por ingeniería genética de un segundo epítipo definido por la unión con JAR 33 (es decir, R180/E192). Cabe señalar que, entre las cepas de tipo silvestre que expresan la v.2 o la v.3 de fHBP, la expresión de JAR 32 se suele asociar con la expresión de JAR 33, mientras que la expresión de JAR 11 normalmente se asocia con la expresión de JAR 10 (véase, por ejemplo, el grupo de cepas, Figura 8).

EJEMPLO 10: VACUNAS QUIMÉRICAS ILUSTRATIVAS ADICIONALES

20 La Tabla 2 y las Figuras 15 y 16 proporcionan vacunas quiméricas hipotéticas adicionales, designadas Quimera III, Quimera IV y Quimera V. Cada una de estas fHBP quiméricas se generan usando una estrategia similar a la usada para generar la Quimera I para proporcionar una fHBP quimérica que genere anticuerpos anti-v.1 y v.2 bactericidas.

25 Como se ilustra en la Figura 15, la Quimera III contiene el dominio A y el dominio B proximal de la subvariante v.1.10 codificada por la fHBP de NZ98/254, y usa el mismo dominio B distal y dominio C de la Quimera I y la Quimera II.

La Quimera IV, que se ilustra en la Figura 15, incluye los dominios A y B proximal de la Quimera I y la Quimera II, pero sustituye los dominios B y C distales de v.2 de la cepa 8047 (v.2.1) de estas quimeras con las de RM1090 (subvariante v.2).

30 La Quimera V fusiona el dominio A y el dominio B proximal de un subvariante v.1 (cepa NZ98/254) con los dominios B y C distales de la subvariante de v.2 (cepa RM1090).

35 En la Figura 16, se muestran los cambios de aminoácidos que generarán los respectivos antígenos de vacuna de Quimera III, IV y V, en comparación con las respectivas secuencias de aminoácidos del dominio A y B proximal de MC58 y los dominios B y C distales de 8047 usados para preparar la Quimera I. Las Quimeras III y V pueden proporcionar una mayor amplitud de protección contra ciertas cepas que expresan subvariantes de v.1, tales como NZ98/254, que no está cubierta por las vacunas de Quimera I o Quimera II. Las Quimeras IV y V pueden establecer una mayor protección contra las cepas de v.3 que están mal cubiertas por la Quimera I o la Quimera II.

40 La Tabla 2 proporciona un resumen de la expresión de epítipos observada para la Quimera I y la Quimera II, y, además, establece la expresión de epítipos predicha para las Quimeras III, IV y V propuestas.

Tabla 2. Expresión de epítipos predicha (u observada) por proteínas quiméricas

mAb	Variante 1		Variante 1/2/3	Variante 2/3			
	mAb 502/JAR1	JAR 3/5		JAR 11	JAR 13	JAR 32/35	JAR 33
Dominio	C	B	C	C	C	C	C
Epítipo	R204	G121	K180 y E192	A174	S216	K174	R180, E192
Proteínas de tipo silvestre							
MC58 (v.1)	1	1	0	0	0	0	0
NZ98/254 (v.1, sv)	0	1	1	0	0	0	0
8047 (v.2)	0	0	1	1	1	0	0
RM1090 (v.2, sv)	0	0	0	0	0	1	1
Proteínas quiméricas							
Quimera I	0	1	1	1	1	0	0
Quimera II	0	1	1	0	1	1	0

Quimeras propuestas									
Quimera III	0	1		1		1	1	0	0
Quimera IV	0	1		0		0	0	1	1
Quimera V	0	1		0		0	0	1	1

1 = presencia de epítipo; 0 = ausencia de epítipo; sv, subvariante.
 El mAb 502 fue descrito por Giuliani *et al.* (*Infect Immun* 2005; 73:1151-60). JAR 3 y 5 se prepararon contra una v.1 de fHBP (gen de la cepa MC58) (Welsch *et al.* *J Immunol* 2004; 172:5606-15). JAR 10, 11 y 13 se prepararon contra una proteína v.2 (gen de la cepa 2996) (Beernink *et al.* *J Infect Dis* 2007; 195:1472-9), y JAR 32, 33 y 35 se prepararon contra una proteína v.3 (gen de la cepa M1239). Cada uno de los mAb reacciona con la proteína de la variante que se usó para inmunizar al ratón. Algunos de los mAb también reaccionan de forma cruzada con subconjuntos de proteínas de otros grupos de variantes.
 Se construyeron las Quimeras I y II que contenían los restos de aminoácidos 1 a 135 codificados por el gen v.1.1 de fHBP (MC58) fusionados con los restos 136 a 255 del gen v.2.1 de 8047. La Quimera II también contiene una mutación puntual A174K introducida en el dominio C que inactiva el epítipo reconocido por JAR 11 e introduce el epítipo reconocido por JAR 32/35.
 Las Quimeras III, IV y V propuestas son ejemplos de fHBP quiméricas adicionales con la expresión de epítopos predicha según lo definido por la unión de los respectivos mAb JAR mostrados.

Otras modificaciones de la fHBP quimérica incluyen la variación del resto dentro del dominio B heterólogo en el que la secuencia del dominio B de v.1 de fHBP finaliza y la secuencia del dominio B de v.2 (o v.2) de fHBP finaliza. En concreto, aunque se usó el resto G136 como la posición del "cruce" entre las variantes de fHBP, el residuo del "cruce" puede ser cualquier resto C-terminal de la secuencia de aminoácidos que define el epítipo JAR 3/JAR 5, pudiéndose seleccionar también un resto de M123-S136. Además, las posiciones de los restos C-terminales con respecto a G136 (E137-D142), o las posiciones de los restos adyacentes o de dentro de la hélice α AH2 (K143-A150, previas a la primera cadena β) pueden ser posiciones adecuadas de restos de cruce. Por lo tanto, en el presente documento, se contempla una serie de diferentes posiciones de los restos de cruce, pudiendo estar el resto de cruce situado detrás de G121 del epítipo JAR 3/5 (G121) a través de e incluyendo A174 del epítipo JAR 11, donde la presencia del epítipo JAR 3/5 se puede evaluar usando métodos de inmunoensayo conocidos en la técnica. (Cabe señalar que la numeración anterior se basa en el número de secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia de fHBP de MC58).

15 **EJEMPLO 11: EXPRESIÓN DE FHBP QUIMÉRICA EN N. MENINGITIDIS**

La Figura 33 muestra una transferencia Western de muestras de *N. meningitidis* que expresan la fHBP de tipo silvestre (WT) o una fHBP quimérica (Quimera I (véase la Fig. 23)). La Quimera I correspondía a una fHBP de longitud completa y además incluía la secuencia señal (pero carecía de cualquier marcador de epítipo tal como un marcador Penta-His) Como se muestra en la Figura 33, las células bacterianas transformadas con el plásmido que contiene el gen que codifica la Quimera I eran positivas en ambos mAb anti-fHbp, mientras que las células de H44/76 transformadas con el plásmido que contiene el gen que codifica la v.2 de fHbp o H44/76 WT solo reaccionan con JAR 3 (v.1) y las células de 8047 solo reaccionan con JAR 13 (v.2).

25 **DEPÓSITO DE LA ATCC**

Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales JAR 4, JAR 5, JAR 11 y JAR 32 fueron depositados en virtud de los términos del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, EE.UU. (ATCC) en la fecha indicada en la siguiente tabla, y recibieron las denominaciones expuestas en la siguiente tabla.

Depósito de la ATCC n.º (Datos del depósito)	Material depositado
PTA-8943 (7 de febrero, 2008)	Hibridoma productor del anticuerpo monoclonal JAR 4
PTA-8941 (7 de febrero, 2008)	Hibridoma productor del anticuerpo monoclonal JAR 5
PTA-8940 (7 de febrero, 2008)	Hibridoma productor del anticuerpo monoclonal JAR 10
PTA-8938 (7 de febrero, 2008)	Hibridoma productor del anticuerpo monoclonal JAR 11
PTA-8942 (7 de febrero, 2008)	Hibridoma productor del anticuerpo monoclonal JAR 32
PTA-8939 (7 de febrero, 2008)	Hibridoma productor del anticuerpo monoclonal JAR 33

Cabe señalar que el mAb JAR 5 se une específicamente a un epítipo que al menos se solapa con el epítipo unido específicamente por el mAb JAR 3, y que el mAb JAR 32 se une específicamente a un epítipo que al menos se solapa con el epítipo unido específicamente por el mAb JAR 35.

Estos depósitos se realizaron en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines del procedimiento de patentes y el reglamento en virtud del mismo (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a

partir de la fecha del depósito y durante al menos cinco (5) años después de la solicitud más reciente de entrega de una muestra del depósito recibida por el depositario. Los depósitos se pondrán a disposición del público por la ATCC en virtud de los términos del Tratado de Budapest, y estarán sujetos a un acuerdo entre el Hospital Infantil y el Centro de Investigación de Oakland y la ATCC (el cesionario de la presente solicitud) que garantice que todas las

5 restricciones impuestas por el depositario sobre la disponibilidad al público del material depositado se eliminarán de manera irrevocable tras la concesión de la correspondiente patente estadounidense, que garantice la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo del depósito al público tras la publicación de la patente de EE.UU. pertinente o tras la apertura a inspección pública de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, lo

10 que ocurra primero, y que garantice la disponibilidad de la progenie a cualquiera determinado por el Comisionado estadounidense de Patentes y Marcas que tenga derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las reglas del Comisionado conforme a la misma (incluyendo 37 C.F.R. § 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

El/los cesionario/s de la presente solicitud ha/n acordado que, en caso de muerte, pérdida o destrucción de un cultivo de los materiales en depósito cultivado en condiciones adecuadas, los materiales serán reemplazados con prontitud con respecto a la notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se ha de

15 interpretar como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos otorgados en virtud de la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína quimérica de unión al factor H (fHBP) que comprende, del extremo N al extremo C:

- 5 a) una primera secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGK de un dominio B de la variante 1 (v.1) de fHBP, en la que el dominio B comprende una secuencia GEHT; y
 b) ligada operativamente a a), una segunda secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua de una variante 2 (v.2) o una variante 3 (v.3) de fHBP;

10 en la que la primera y la segunda secuencias de aminoácidos están ligadas operativamente en un punto de unión situado en un sitio no más de 13 restos N-terminal de la secuencia GEHT y no más de 34 restos C-terminal de la secuencia GEHT,

15 en la que el punto de unión está ubicado en un dominio B para proporcionar un dominio B heterólogo o en un dominio C para proporcionar un dominio C heterólogo de la fHBP quimérica;

en la que la fHBP quimérica comprende el epítipo unido por el anticuerpo JAR 11 (ATCC PTA-8938) o el anticuerpo JAR 32 (ATCC PTA-8942);

en la que la fHBP quimérica comprende el epítipo unido por el anticuerpo JAR 5 (ATCC PTA-8941);

20 en la que cuando el punto de unión está ubicado en el dominio B, el punto de unión está ubicado en un sitio no más de 13 restos N-terminal de la secuencia GEHT y no más de 24 restos C-extremo Con respecto a la secuencia GEHT;

en la que cuando el punto de unión está ubicado en el dominio C, el punto de unión está ubicado en un sitio no más de 34 aminoácidos C-extremo Con respecto a la secuencia GEHT.

25 2. La proteína quimérica de unión al factor H (fHBP) de la reivindicación 1 que comprende:

a) un dominio B heterólogo que comprende, del extremo N al extremo C,

30 i) una secuencia de aminoácidos contigua N-terminal de un dominio B de la variante 1 (v.1) de la proteína de unión al factor H (fHBP); y

ii) una secuencia de aminoácidos contigua C-terminal de un dominio B de la variante 2 (v.2) de la fHBP o un dominio B de la variante 3 (v.3) de la fHBP; y

35 b) un dominio C ligado operativamente al dominio B heterólogo de a), en donde el dominio C comprende una secuencia de aminoácidos contigua de un dominio C de la variante 2 (v.2) de la fHBP o un dominio C de la variante 3 (v.3) de la fHBP;

comprendiendo la fHBP quimérica el epítipo unido por el anticuerpo JAR 5 (ATCC PTA-8941).

40 3. La fHBP quimérica de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la secuencia de aminoácidos contigua del dominio B de v.1 de fHBP comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos contigua de

45 LTAFAQ TEQIQDSEHS GKMLAKRQFR IGDIA,
 TEQIQDSEHS GKMLAKRQFR IGDIAGEHTA FNQLPD o
 QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GKMLAKRQFR IGDIAGEHTA FNQLPD.

4. La fHBP quimérica de la reivindicación 3, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio B heterólogo comprende una o más de:

50 una sustitución de leucina (L) con la fenilalanina (F) en la posición del resto 9 de QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GK;

una sustitución de una valina (V) o un ácido glutámico (E) con isoleucina (I) en la posición del resto 4 de QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GK;

55 una sustitución de una prolina (P) con serina (S) en la posición del resto 17 de QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GK;

una sustitución de un ácido aspártico (D) con histidina (H) en la posición del resto 19 de QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GK;

60 una sustitución de una arginina (R) con glutamina (Q) en la posición del resto 28 de la secuencia QSHSALTAFQ TE-QIQDSEHS GKMLAKRQFR IGDIAGEHTA FNQLPD; y

una sustitución de valina (V) con alanina (A) en la posición del resto 35 de la secuencia QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GKMLAKRQFR IGDIAGEHTA FNQLPD.

65 5. La fHBP quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio B heterólogo comprende una sustitución de aminoácido en una o más posiciones que son polimórficas en una variante 1 de fHBP natural.

6. La fHBP quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la fHBP quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio A de una v.1, v.2 o v.3 de fHBP en posición N-terminal del, y ligado operativamente al dominio B heterólogo.
- 5
7. La fHBP quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la fHBP quimérica comprende al menos un epítipo que cuando es unido por un anticuerpo bloquea la unión de fH a fHBP.
- 10
8. La fHBP quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la fHBP quimérica comprende un par de epítipos que generan anticuerpos que, cuando se unen a sus respectivos epítipos, presentan actividad bactericida.
- 15
9. La fHBP quimérica de la reivindicación 8, en la que el par de epítipos es el epítipo unido por al anticuerpo JAR 10 (ATCC PTA-8940) y el epítipo unido por al anticuerpo JAR 11 (ATCC PTA-8938).
- 20
10. La fHBP quimérica de la reivindicación 8, en la que el par de epítipos es el epítipo unido por al anticuerpo JAR 33 (ATCC PTA- 8939) y el epítipo unido por al anticuerpo JAR 32 (ATCC PTA-8942).
11. La fHBP quimérica de la reivindicación 1, en la que el punto de unión está situado en el dominio C, de manera que la fHBP quimérica comprende un dominio C heterólogo, en donde el dominio C heterólogo comprende una secuencia de aminoácidos N-terminal KLTYTIDFA.
- 25
12. Un ácido nucleico que codifica la fHBP quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
13. Una célula hospedadora recombinante que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 12.
14. Un método de producción de una fHBP quimérica, método que comprende:
- 30
- cultivar la célula hospedadora recombinante de la reivindicación 13 en condiciones adecuadas para la expresión de la fHBP quimérica; y
aislar la fHBP quimérica.
- 35
15. Una composición inmunogénica que comprende una fHBP quimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
16. La composición inmunogénica de la reivindicación 15, en la que la fHBP quimérica está en un preparado de vesículas realizado a partir de una cepa de *Neisseria meningitidis*.
- 40
17. Una fHBP quimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición de las reivindicaciones 15 o 16 para su uso en un método de vacunación de un mamífero.

Figura 1.

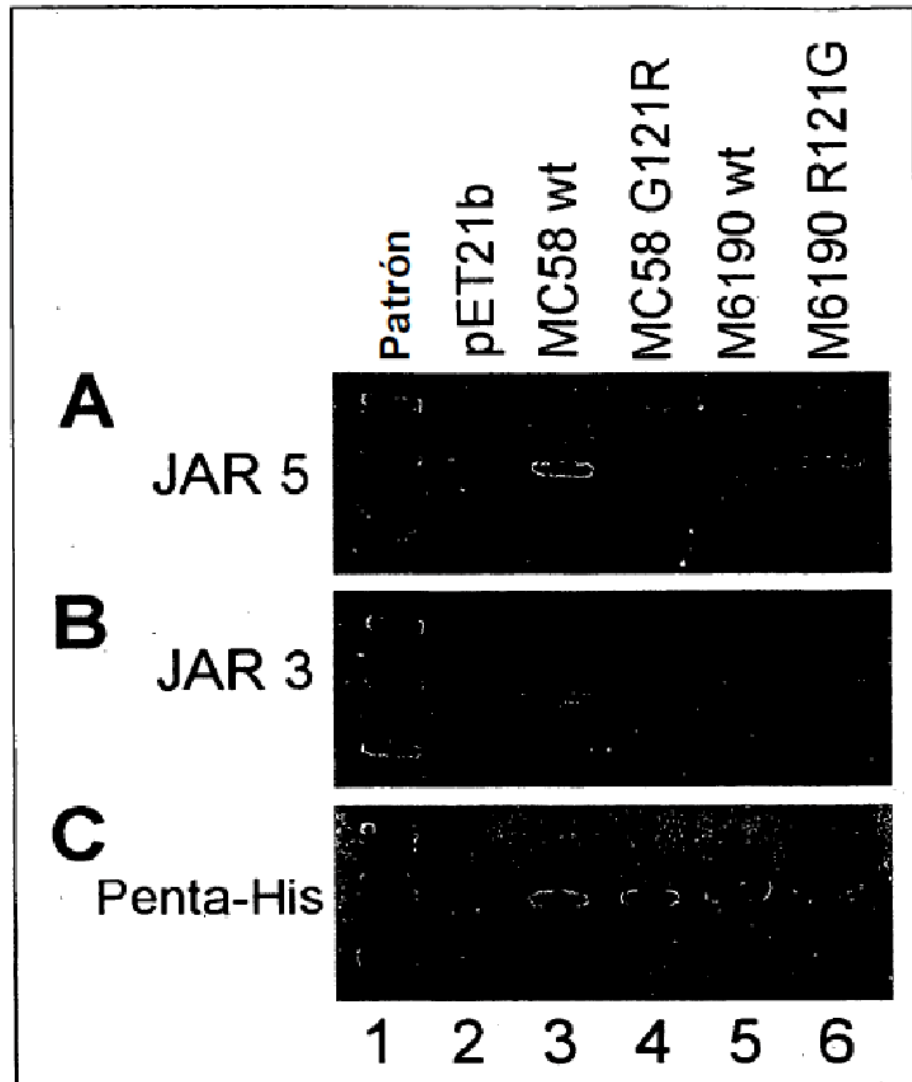


Figura 2.

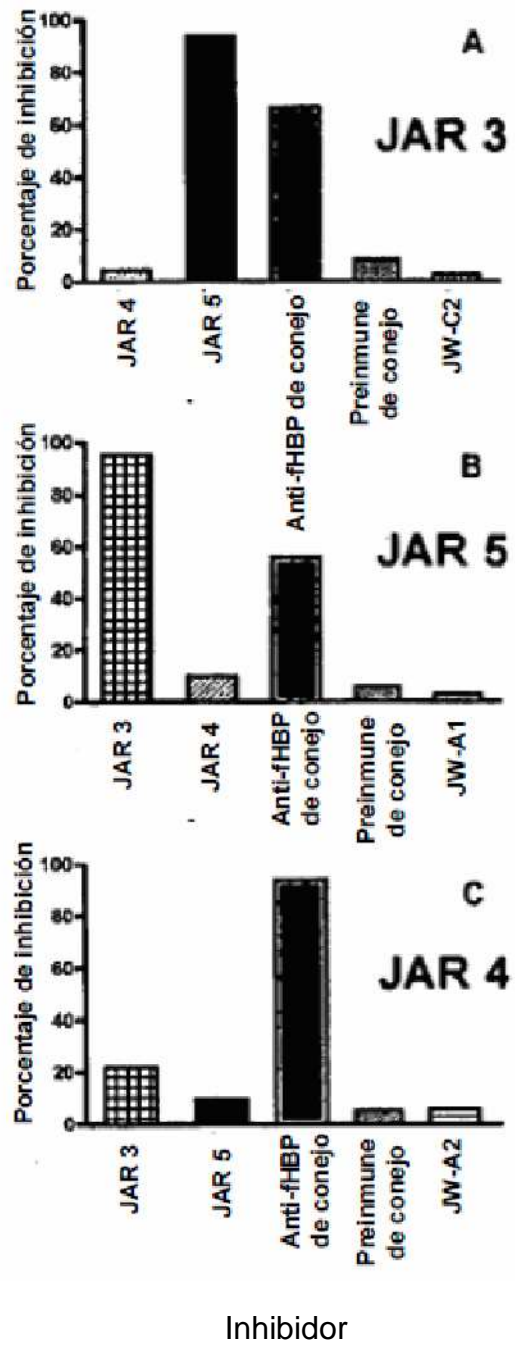


Figura 3.

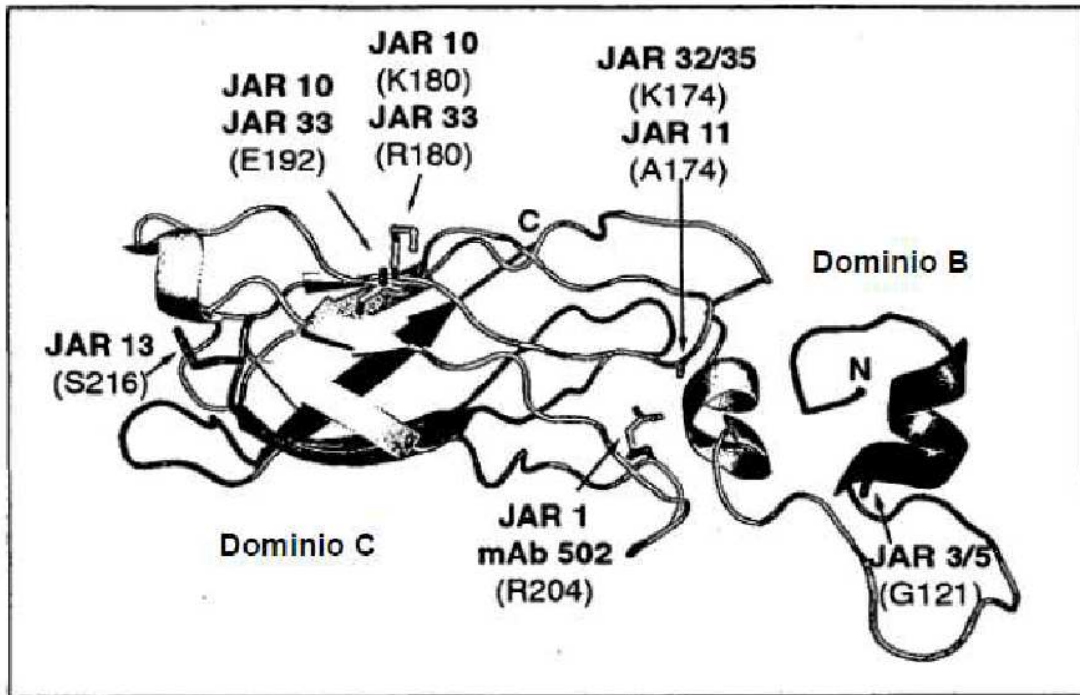


Figura 4.

```

*****
v.2 8047 VAADIGARLADALTAPLDHRDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLK 69
Quimera I VAADIGAGLADALTAPLDHRDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLK 69
Quimera II VAADIGAGLADALTAPLDHRDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLK 69
v.1 MC58 VAADIGAGLADALTAPLDHRDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLK 69
*****

v.2 8047 NDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFOIYKDDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLV 131
Quimera I NDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFOIYKDDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLV 131
Quimera II NDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFOIYKDDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLV 131
v.1 MC58 NDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFOIYKDDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLV 131
*****

v.2 8047 SGLGGEHTAFNQLPDG-KAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGKIEHLKTPEQNVEL 193
Quimera I GDIA GEHTAFNQLPDG-KAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGKIEHLKTPEQNVEL 193
Quimera II GDIA GEHTAFNQLPDG-KAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGKIEHLKTPEQNVEL 193
v.1 MC58 GDIA GEHTAFNQLPDG-KAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGKIEHLKSPELNVDL 193
*****

v.2 8047 AAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYNLALPGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 255
Quimera I AAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYNLALPGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 255
Quimera II AAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYNLALPGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 255
v.1 MC58 AAADIKPDGKRHIAVISGSLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAARQ 255
*****

```

Dominio
"B"

Figura 5.

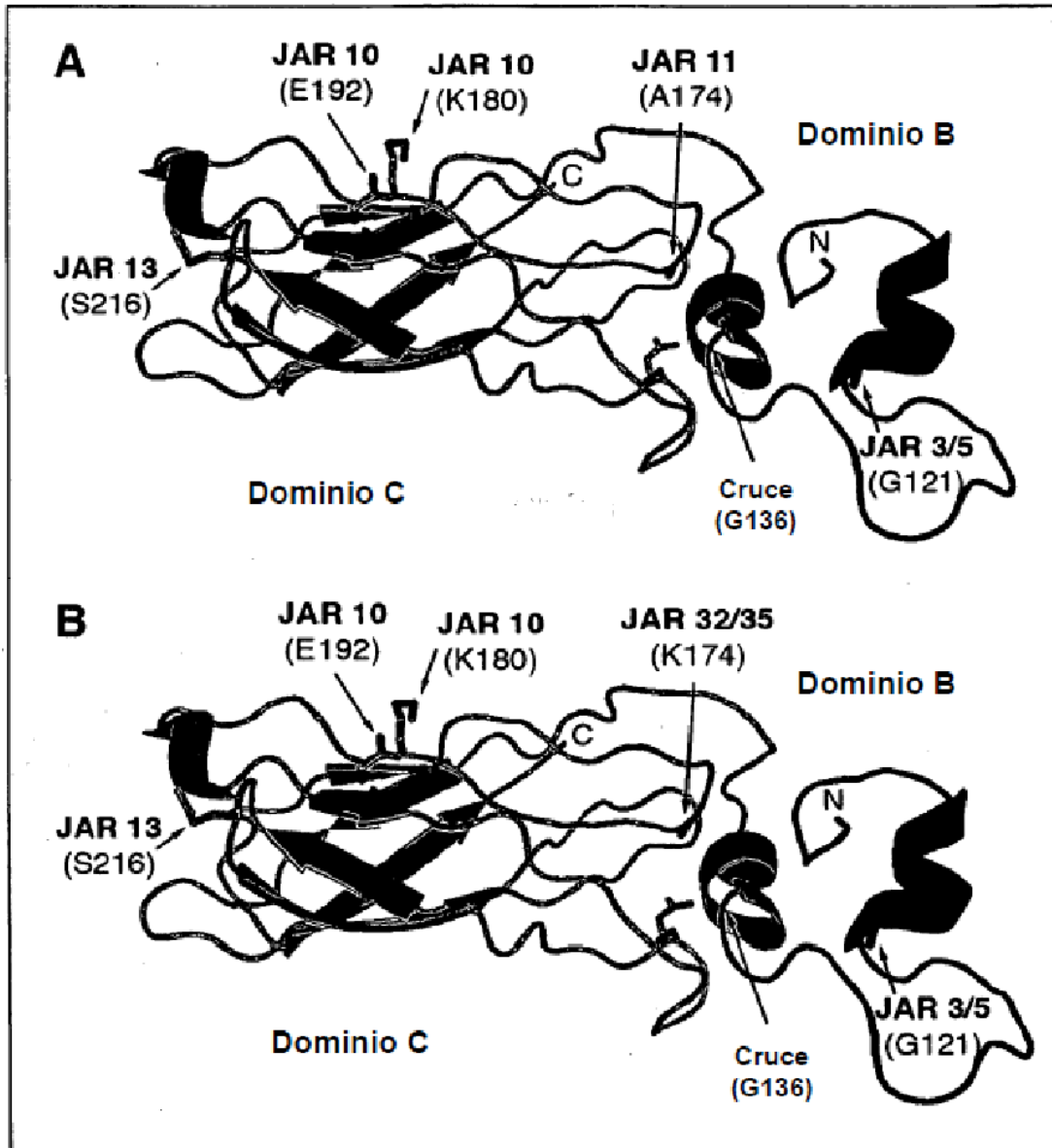


Figura 6.

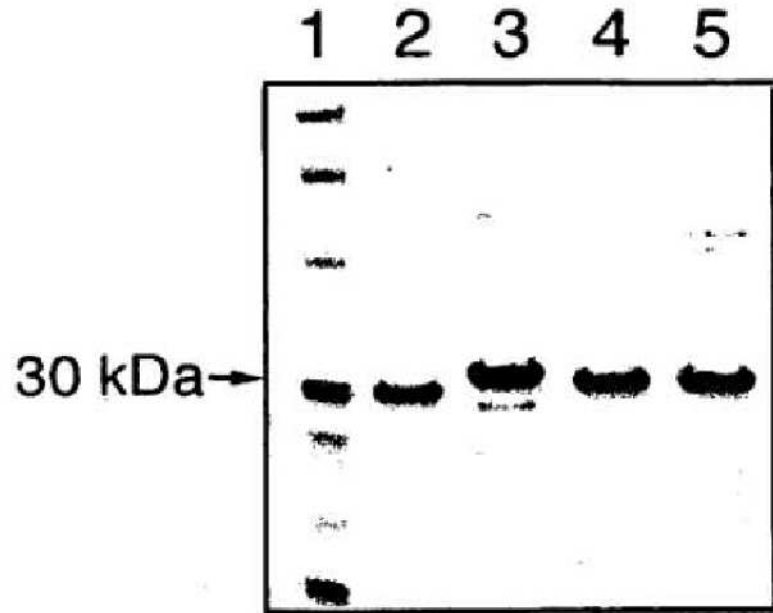


Figura 7.

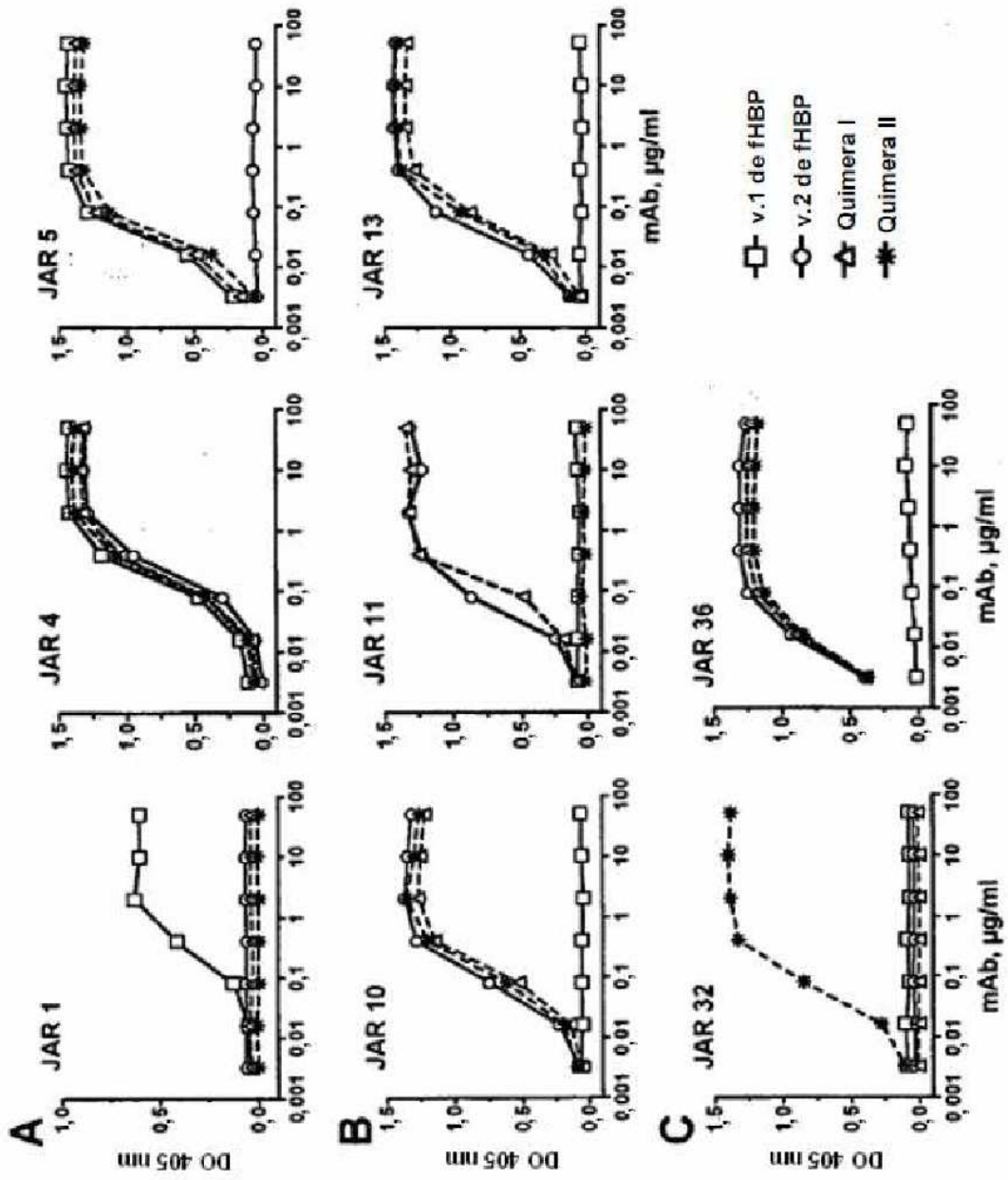


Figura 8A

Características de las cepas				
Cepa ¹	Origen	Complejo ST (ST) ¹	Tipos de proteínas porina ²	
			PorB	PorA
H44/76	Noruega	ST-32 (32)	15	1.7,16
SK080	California	ST-162 (162)	3-73	1.22,14
SK084	California	ST-32 (32)	3-24	1.7,16
NZ98/254	Nueva Zelanda	ST-41/44 (42)	4	1.7-2,4
SK141	Tennessee	ST-213 (213)	3-14	1.22,14
8047	EE.UU.	ST-8 (8)	2b	1.5-1,2-2
MD1435	Maryland	ST-35 (35)	339	1.22-1,14
MD1321	Maryland	ST-41/44 (44)	3-45	1.7-1,1
03S-0658	California	ST-32 (1364)	3-38	1.7-2,13-1
M1239	EE.UU.	ST-41/44 (437)	14	P1.23,14
SK104	Carolina del norte	ST-162 (5748) (S5)(5748)	3-73	1.22,14

¹ST, Tipo de secuencia determinado por la tipificación de secuencias de múltiples loci.
²Tipos de porina determinados por secuenciación del ADN de regiones bucle variables

Características de fHBP expresada por cepas												
Cepa	Variante ¹	% identidad de AA ²			Reactividad de mAb JAR ³							
		v.1	v.2	v.3	v.1	3/5	10	11	13	32/35	33	36
H44/76	1	100	72	59	1	1	0	0	0	0	0	0
SK080	1	93	69	61	0	1	0	0	0	0	0	0
SK084	1	96	72	61	0	1	0	0	0	0	0	0
NZ98/254	1	91	74	61	0	1	1	0	0	0	0	0
SK141	1	89	71	63	0	1	1	0	0	0	0	0
8047	2	72	100	85	0	0	1	1	1	0	0	1
MD1435	2	72	99	86	0	0	1	1	1	0	0	1
MD1321	2	72	94	84	0	0	1	1	0	0	0	1
03S-0658	2	69	94	88	0	0	0	0	0	1	1	1
M1239	3	59	85	100	0	0	0	0	1	1	1	1
SK104	3	59	85	97	0	0	0	0	1	1	1	1

¹Determinado por PCR cuantitativa según lo descrito previamente (Beernink *et al.*, *Clin Vacc Immunol* 13(7):758-763.

²En comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína madura con la del prototipo v.1 de fHBP, cepa MC58; v.2, cepa 8047; o v.3, cepa M1239.

³Reactividad de mAb según lo determinado por ELISA (véase "Materiales y métodos"). JAR 1 y JAR 5 proceden de un ratón inmunizado con v.1 de fHBP (cepa CM58); JAR 10, 11 y 13 procedían de un ratón inmunizado con v.2 de fHBP (cepa 2996); JAR 32, 33 y 36 procedían de un ratón inmunizado con v.3 de fHBP (cepa M1239). Todos reaccionan con la respectiva fHBP usada como inmunógeno (véase la Tabla de la Figura 17).

Figura 8B

Identidad de secuencia de aminoácidos por grupo de variante antigénica, cepa y dominio de fHBP																			
Identidad de secuencia de aminoácidos, % ¹																			
Cepa	Variante ⁴	Dominio A									Dominio B ²						Dominio C		
		AA 1-100 ³			AA 101-135			AA 101-164			AA 136-164			AA 165-255					
		v.1	v.2	v.3	v.1	v.2	v.3	v.1	v.2	v.3	v.1	v.2	v.3	v.1	v.2	v.3			
H44/76	1	100	97	77	100	28	28	28	100	46	42	100	67	60	100	59	52		
NZ98/254	1	99	98	76	85	31	31	31	85	47	44	86	67	60	83	61	53		
8047	2	97	100	76	28	100	94	94	46	100	93	67	100	92	59	100	85		
03S-0658	2	99	98	78	28	100	94	94	42	95	95	60	89	96	52	83	90		
M1239	3	77	76	100	28	94	100	100	42	93	100	60	92	100	52	85	100		
SK104	3	77	76	100	28	100	94	94	44	95	95	64	89	96	52	84	91		

¹En comparación con la secuencia de aminoácidos (AA) de la proteína madura con la del prototipo v.1 de fHBP, cepa MC58; v.2, cepa 8047; o v.3, cepa M1239.

²101-164, dominio B según lo definido por Giuliani et al., *Infect. Immun.*, 2005, 101-135, dominio B hasta el punto de unión de la Quimera I o II (denominado parte N-terminal del dominio B); 136-164, dominio B partiendo del punto de unión y acabando en el dominio C (denominado parte C-terminal del dominio B).

³La numeración de AA se basa en la proteína madura (es decir, la que carece de secuencia señal) de la cepa MC58.

⁴Determinado por PCR cuantitativa según lo descrito previamente (Beernink et al., *Clin Vacc Immunol* 13(7):758-763).

Figura 9.

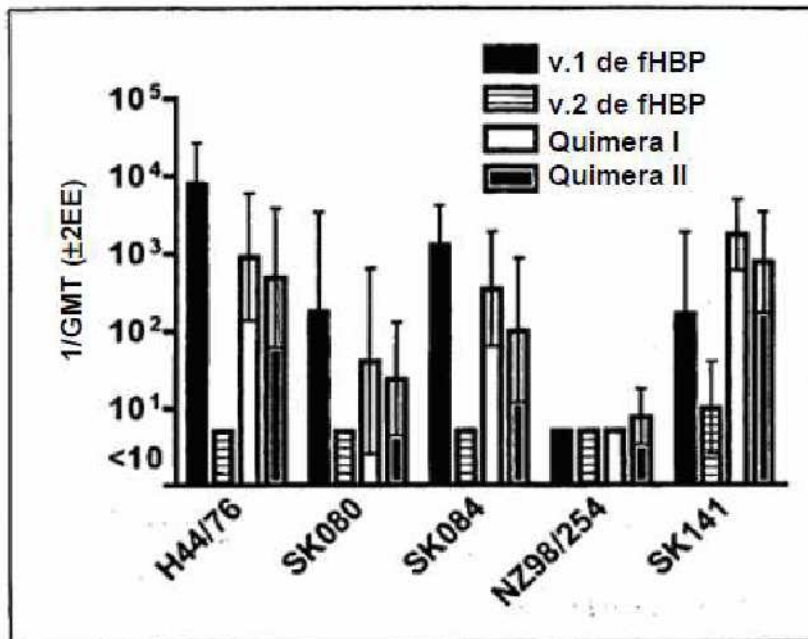


Figura 10.

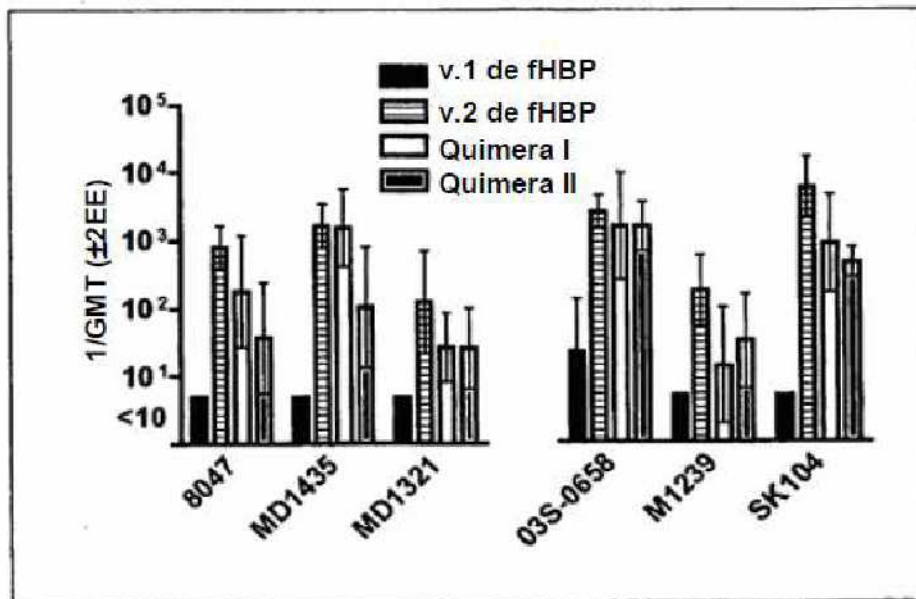


Figura 11.

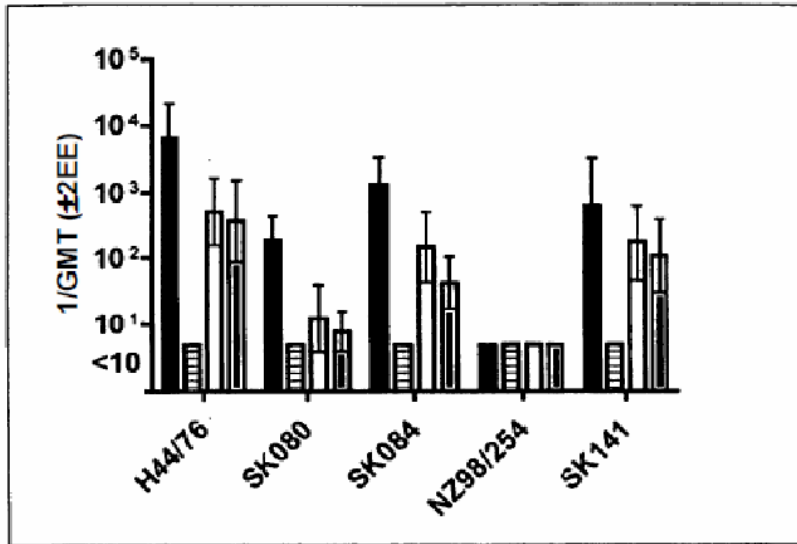


Figura 12.

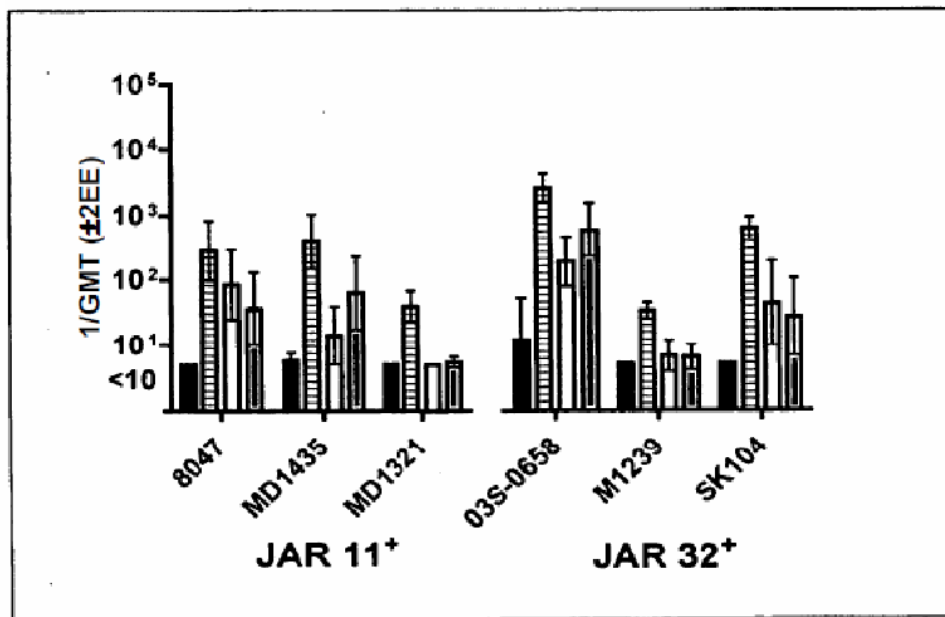


Figura 13.

		<-- Parte C-terminal de fHbpN		---->		<-- fHbpC	
						ααα	
MC58	101	QSHSALTAFQTEQIQDSEHS	SGKM VAKRQFRIGDIAGEHT	SFDKLPE	146		
M4105	101	QSHSALTALQTEQVQDSEHS	SGKM VAKRQFRIGDIAGEHT	SFDKLPE	146		
4243	101	QSHSALTALQTEQVQDSEDS	SGKM VAKRQFRIGDIAGEHT	SFDKLPE	146		
M6190	101	QSHSALTALQTEQVQDSEHS	SGKM VAKRQFRIGDIAGEHT	SFDKLPE	146		
NZ98/254	101	QSHSALTALQTEQEODPEHS	SGKM VAKRRFKIGDIAGEHT	SFDKLPE	146		
NM452	101	QSHSALTALQTEQVQDSEHS	SGKM VAKRQFRIGDIVGEHT	SFGKLPE	146		
CDC1573	101	QSHSALTALQTEQEODPEHS	SGKM VAKRRFRIGDIAGEHT	SFDKLPE	146		
03S-0408	101	QSHSALTALQTEQVQDSEHS	SGSM VAKRQFRIGDIAGEHT	SFDKLPE	146		
		*****:**** **.* * *****:!:*****.*****.***:					

Figura 14.

		←----- fHbpC ----->	
		←----- Dominio B ----->	
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">JAR 11</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">JAR 10</div> </div>	
8047	141	AFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKA	200
M98-250572	141	AFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKA	200
M98-250809	141	AFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFATKQGGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKA	200
6557	141	AFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGHGKIEHLKTPEQNVELASAEKA	200
FAM18	141	AFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNRRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKA	200
C2120	141	AFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFASKQGGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKA	200
M1239	141	AFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELAAAEKA	200
M98-250771	141	AFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGHGKIEHLKTPEQNVELASAEKA	200
Ngo_FA1090	141	AFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGGHGKIEHLKTPEQNVELASAEKA	200
		*****.*****.*****.*!* *!*:***: ***:!:***** *****:*****	
		<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin: 10px auto; width: 100px;">JAR 13</div>	
		←----- fHbpC ----->	
8017	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	255
M98-250572	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVEIGEKVHEIGIAGKQ	255
M98-250809	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	255
6557	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ	255
FAM18	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ	255
C2120	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	255
M1239	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	255
M98-250771	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ	255
Ngo_FA1090	201	DEKSHAVILGDTRYGSEEEKGTYRLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIADKQ	255
		*****.*****.*****.*****.*****:!* *****.*	

Figura 15.

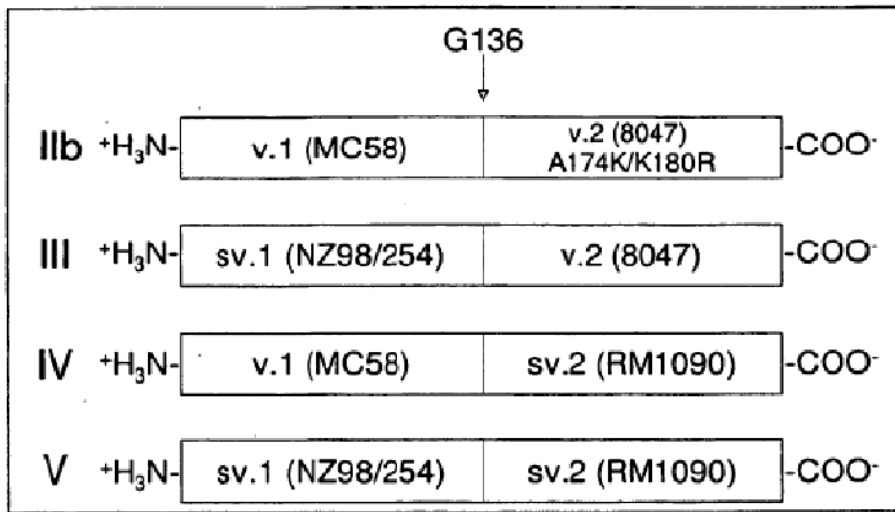


Figura 16.

III sv1 NZ98/254	TEQEODPEHS	<u>G</u> KMVAKRFRK	IGDIA	<u>GEHTA</u>	FNQLP-DGKA	EYHGKAFSSD	v2 8047
IV v1 MC58	TEQIQDSEHS	<u>G</u> KMVAKRQFR	IGDIA	<u>GEHTA</u>	FNQLP-SGKA	EYHGKAFSSD	sv2 RM1090
V sv1 NZ98/254	TEQEODPEHS	<u>G</u> KMVAKRFRK	IGDIA	<u>GEHTA</u>	FNQLP-SGKA	EYHGKAFSSD	sv2 RM1090

Figura 17. Anticuerpos monoclonales anti-fHBP murinos

mAb JAR (inmunógeno ¹)	Variantes de reactividad cruzada (ELISA) ²	Isotipo de Ig	Inhibe la unión de fH ³
(v.1 de rfHBP)			
1	v.1 (subconjunto)	G3	Sí
3	v.1 (casi toda)	G3	Sí
4	v.1, v.2 (alta reactividad y v.3 (reactividad inferior)	G2a	No
5	v.1 (casi toda)	G2b	Sí
(v.2 de rfHBP)			
10	v.1 (subconjunto), v.2 (subconjunto) y v.3 (subconjunto)	G1	No
11	v.2 (subconjunto) y v.3	G2a	Parcial
13	(subconjunto) v.2 (subconjunto) y v.3 (toda)	G2a	Sí
(v.3 de rfHBP)			
32	v.3 y v.2 (subconjunto)	G2a	Sí
33	v.3 y v.2 (subconjunto)	G2a	No
35	v.3 y v.2 (subconjunto)	G2b	Sí
369	v.3 y v.2 (casi toda)	G2b	Parcial
¹ Ratones inmunizados con proteínas recombinantes expresadas a partir de los genes de las cepas de <i>N. meningitidis</i> MC58 (v.1), 2996 (v.2) y M1239 (v.3). Todos los mAb muestran pruebas de actividad bactericida mediada por complemento sinérgica cuando se ensayan con un segundo mAb (véase la Figura 18), lo que demuestra el reconocimiento de los epítopos accesibles desde la superficie.			
² A excepción de JAR 4, los resultados se basan en la unión del anticuerpo a las células bacterianas de diferentes cepas medida por ELISA y la identificación de sus respectivos grupos de variantes de fHBP por RT-PCR (Beernik <i>et al.</i> , <i>Clin. Vacc. Immunol.</i> 13(7):758-763). La reactividad cruzada de JAR 4 se basa en la unión a las proteínas recombinantes purificadas en un ELISA y citometría de flujo con células bacterianas vivas (Welsch <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 2004, 172:5606-5615).			
³ Basándose en la inhibición de la unión de fH humano purificado a rfHBP por ELISA en presencia de mAb anti-fHBP JAR (véanse los datos representativos de la Figura 19).			

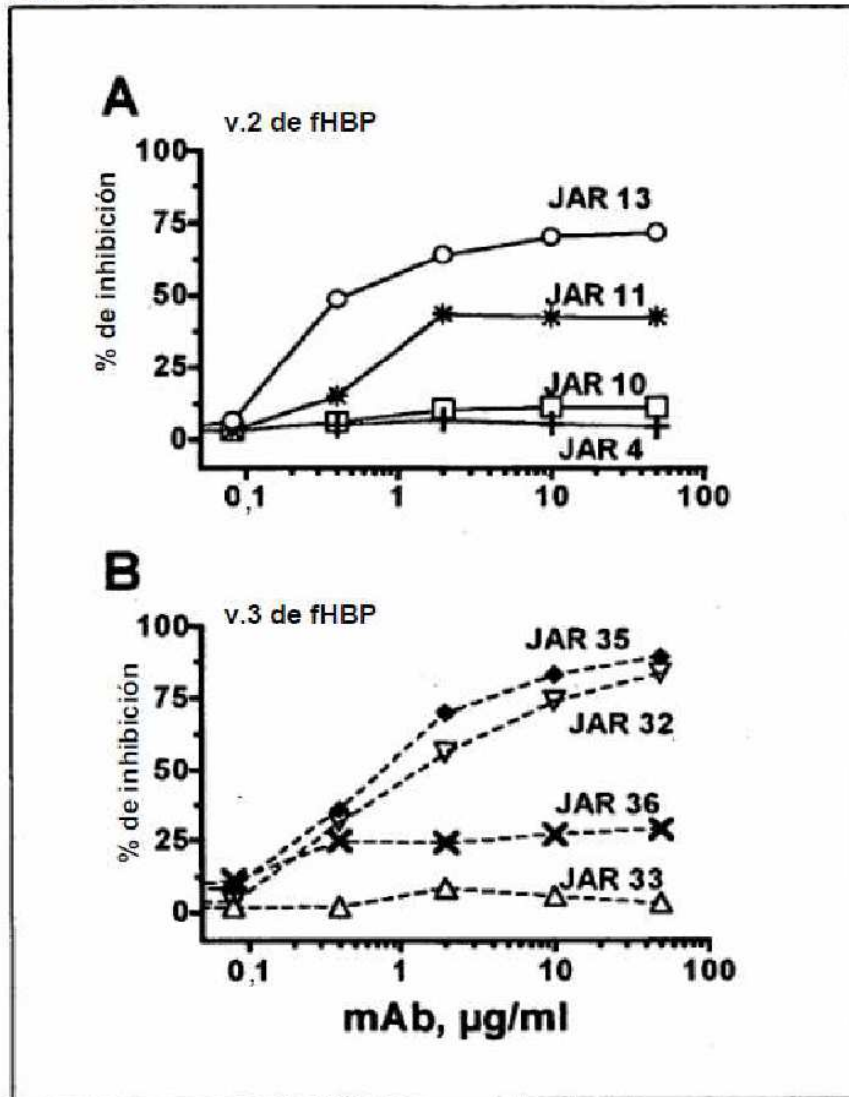
Figura 18.

Actividad bactericida sinérgica mediada por complemento de mAb anti-fHBP ¹					
	Concentración bactericida ₅₀ , µg/ml ² (cepa NZ98/254, v.1)				
mAb JAR (Isotipo de Ig)	3	4	5	10	
3 (G3)	>50	1	>50	>50	
4 (G2a)	1	>50	4	>50	
5 (G2b)	>50	4	>50	>50	
10 (G1)	>50	>50	>50	>50	
Concentración bactericida ₅₀ , µg/ml (cepa 8047, v.2)					
mAb JAR (Isotipo de Ig)	4	10	11	13	36
4 (G2a)	>50	>50	5	4	>50
10 (G1)	>50	>50	5	>50	>50
11 (G2a)	5	5	>50	>50	1
13 (G2a)	4	>50	>50	>50	1
36 (G2a)	>50	>50	1	1	>50
Concentración bactericida ₅₀ , µg/ml (cepa M1239, v.3)					
mAb JAR (Isotipo de Ig)	13	32	33	35	36
13 (G2a)	>50	>50	>50	>50	1
32 (G2a)	>50	>50	1	>50	>50
33 (G2a)	>50	1	>50	5	>50
35 (G2b)	>50	>50	5	>50	>50
36 (G2b)	1	>50	>50	>50	>50

¹JAR 3, 4 y 5 procedían de un ratón inmunizado con v.1 de rFhBP. JAR 10, 11 y 13 procedían de un ratón inmunizado con v.2 de rFhBP. JAR 32, 33, 35 y 36 procedían de un ratón inmunizado con v.3 de rFhBP (véase la tabla de la Figura 17).

²Concentración total de dos mAb que dio lugar a un 50 % de supervivencia de la bacteria tras 60 min de incubación con complemento humano en comparación con UFC/ml en el punto temporal 0. Los datos se muestran solo para pares de mAb para los que la respectiva cepa expresó epítomos reconocidos por ambos mAb.

Figura 19.



C

Inhibición de la unión de fH

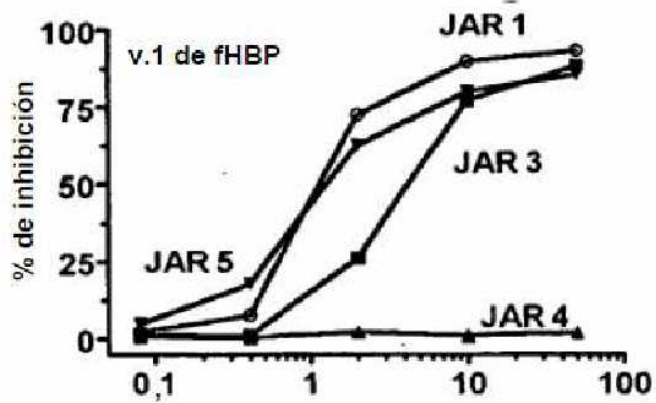


Figura 20

Actividad bactericida de combinaciones de mAb con respecto a las respectivas ubicaciones de los epítomos						
PAR DE mAb JAR	Cepa (variante)	CB ₅₀ combinación µg/ml ¹	Restos de epítomos ²	Distancia aproximada (Å) ³	Inhibición de fH ⁴	Isotipo de Ig
Grupo A (ubicación de ambos epítomos conocidos)						
5 y 502*	H44/76	<1	G121 y R204	16	++ y ND	G2b y G2a
10 y 11	8047 (v.2)	5	K180/E192 y A174	18 a 20	- y +	G1 y G2a
33 y 32	M1239 (v.3)	1	R180/E192 y K174	18 a 20	- y ++	G2a y G2a
33 y 35	M1239 (v.3)	5	R180/E192 y K174	18 a 20	- y ++	G2a y G2b
3 y 10	NZ98/254(v.1)	>50	G121 y K180/E192	31 a 32	++ y -	G3 y G1
5 y 10	NZ98/254(v.1)	>50	G121 y K180/E192	31 a 32	++ y -	G2b y G1
13 y 35	M1239 (v.3)	>50	S216 y K174	27	++ y ++	G2a y G2b
13 y 11	8047 (v.2)	>50	S216 y A174	27	++ y +	G2a y G2a
13 y 32	M1239 (v.3)	>50	S216 y K174	27	++ y ++	G2a y G2a
13 y 33	M1239 (v.3)	>50	S216 y R180/E192	9 a 14	++ y -	G2a y G2a
13 y 10	8047 (v.2)	>50	S216 y K180/E192	9 a 14	++ y -	G2a y G1
3 y 5	NZ98/254(v.1)	>50	G121 y G121	0	++ y ++	G3 y G1
32 y 35	M1239 (v.3)	>50	K174 y K174	0	++ y ++	G2a y G2b
Grupo B (ubicación de un epítomo desconocido)						
4 y 3	NZ98/254(v.1)	1	desconocido + G121	desconocida	- y ++	G2a y G2b
4 y 5	NZ98/254(v.1)	4	desconocido + G121	desconocida	- y ++	G2a y G2b
4 y 10	NZ98/254(v.1)	>50	desconocido+ K180/E192	desconocida	- y -	G2a y G1
4 y 10	8047 (v.2)	>50	desconocido+ K180/E192	desconocida	- y -	G2a y G1
4 y 11	8047 (v.2)	5	desconocido + A174	desconocida	- y +	G2a y G2a
4 y 13	8047 (v.2)	4	desconocido + S216	desconocida	- y ++	G2a y G2a
36 y 13	8047 (v.2)	1	desconocido + S216	desconocida	+ y ++	G2b y G2a
36 y 33	M1239 (v.3)	>50	desconocido+ R180/E192	desconocida	+ y -	G2b y G2a
36 y 32	M1239 (v.3)	>50	desconocido + K174	desconocida	+ y ++	G2b y G2b
36 y 35	M1239 (v.3)	>50	desconocido + K174	desconocida	+ y ++	G2b y G2a

¹Los datos se muestran solo para mAb que individualmente no son bactericidas contra las cepas que expresan fHBP a bajo nivel (CB₅₀ > 50 µg/ml). El Grupo A muestra todas las combinaciones para las que se han identificado los respectivos restos de aminoácidos que afectan al reconocimiento de epítomos por parte de cada uno de los mAb del par. *El resto R204 implicado en la expresión del epítomo del mAb 502 fue descrito por Giuliani *et al* (Giuliani *et al.*, 2005. *Infect. Immun.* 73:1151-1160). El Grupo B muestra las combinaciones restantes en las que la ubicación del epítomo se conoce solo para uno de los dos mAb del par.

²Para los respectivos mAb del par. La numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de la v.1 de fHBP de MC58 que carece de la secuencia señal (Massignani *et al.*, 2003 *J. Exp. Med.* 197:789-799). Cabe destacar que, en realidad, las secuencias de aminoácidos de la proteína v.2 (cepa 8047) y v.3 de fHBP (cepa M1239) difieren en -1 y +7 restos de aminoácido, respectivamente, de la de MC58.

³Las distancias entre los pares de los mAb se calcularon entre las posiciones de los átomos de carbono α de los respectivos restos usando PyMol (<http://www.pymol.org>). JAR 32 y JAR 35 reconocen los epítomos en solapamiento (o idénticos) que incluyen el resto K 174.

⁴Para los respectivos mAb del par: "++", inhibición de la unión del fH (>70 %); "+", inhibición parcial (del 25 al 45 %); "-", sin inhibición (<15 %) (Véase, por ejemplo, la Fig. 19, anterior). ND, no determinada.

Figura 21.

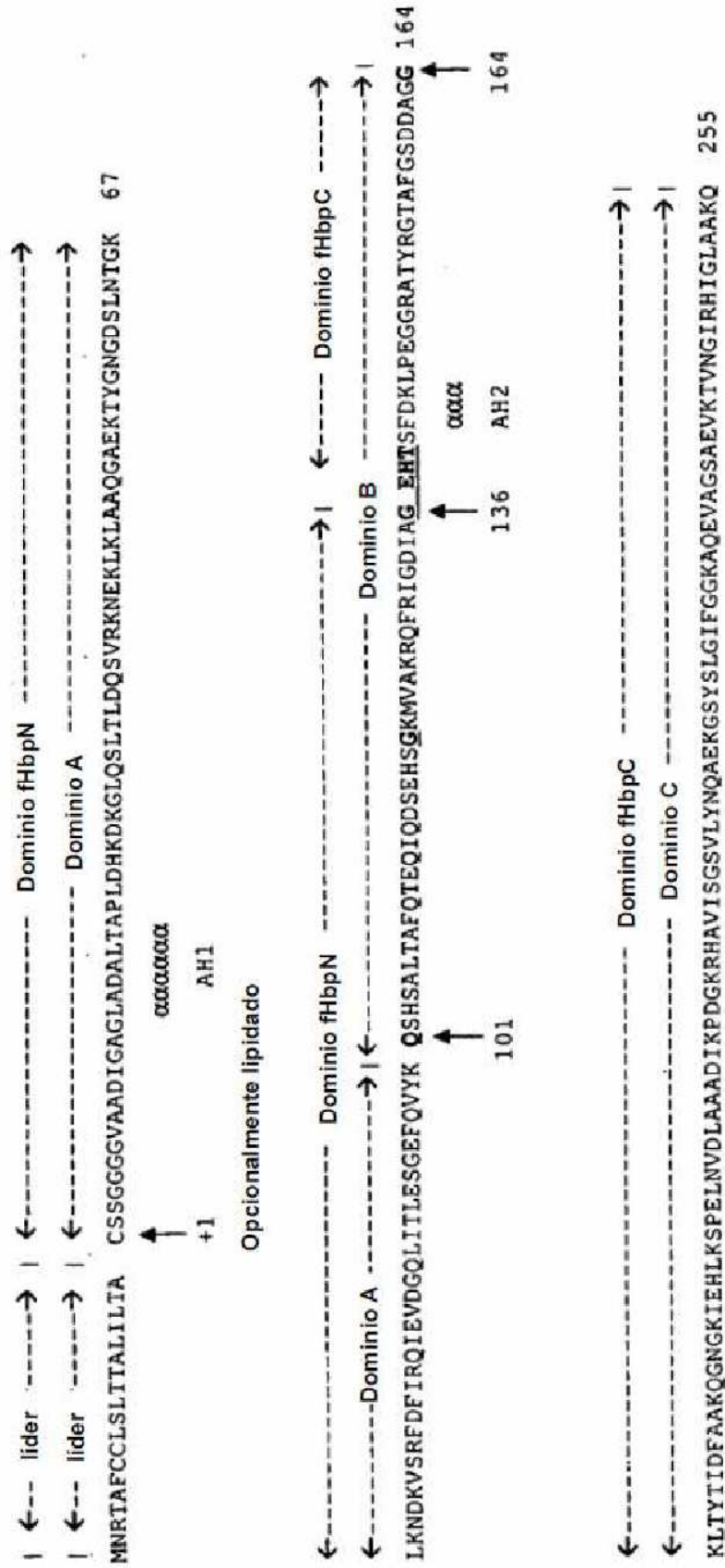


Figura 22
 Grupo A
 Dominio B de v.1 de fHBP (MC58)

| ← Parte N-terminal > | < Parte C-terminal ---> |
 QSHSALTAFTQTEIQDSEHS **G** **M** **V** **A** **K** **R** **Q** **R** **I** **G** **D** **I** **A** **GEHT** **S** **F** **D** **K** **L** **P** **E** **G** **G** **R** **A** **T** **Y** **R** **G** **T** **A** **F** **G** **S** **D** **D** **A** **G** **G**
 † ααα †
 AH2

Grupo B
 Dominio C

| ← ----- Parte C-terminal -----> |
L T Y I D F E A AKQNGKIEHLKSP_{EL}NVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ
 ↑
 Parte N-terminal

Figura 23. Secuencias de nucleótidos y proteína de la Quimera I (MC58/8047)

gtcgccgcccacatcggtgcggggcttgccgatgcactaacccgaccgct
 cgaccataaagacaaaggtttgcagtccttgacgctggatcagtcctgca
 ggaaaaacgagaaactgaagctggcggcacaaggtgcggaaaaaacttat
 ggaaacggtgacagcctcaatacgggcaaattgaagaacgacaaggtcag
 ccgtttcgactttatccgccaaatcgaagtggacgggcagctcattacct
 tggagagtggagagttccaagtatacaaaacaaagccattccgccttaacc
 gcctttcagaccgagcaaatacaagattcggagcattccgggaagatggt
 tgcgaaaacgccagttcagaatcggcgacatagcgGGAGAACATACCGCCT
 TCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTTCAGC
 TCCGACGATGCTGGCGGAAAACCTGACCTATACCATAGATTTTCGCCGCCAA
 ACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAACACCCGAGCAAAATGTCG
 AGCTTGCCGCCGCCGAACCTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATT
 TTGGGCGACACGCGCTACGGCAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGC
 CCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGA
 TAGGGGAAAAGGTTACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

vaadigagladaltaplhdhkdkglsltldqsvrkneklklaaqaekty
 gngdsltngklkndkvsrfdfirqievdgqlitlesgefvykqshsalt
 afqteqiqdsehsgkmvakrqfrigdialGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFS
 SDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVI
 LGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQE IAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ*

Figura 24. Secuencias de nucleótidos y proteína de la Quimera II (MC58/8047 A174K)

gtcgccgcccacatcggtgcggggcttgccgatgcactaacccgaccgct
 Cgaccataaagacaaaggtttgcagtccttgacgctggatcagtcctgca
 Ggaaaaacgagaaactgaagctggcggcacaaggtgcggaaaaaacttat
 Ggaaacggtgacagcctcaatacgggcaaattgaagaacgacaaggtcag
 Ccgtttcgactttatccgccaaatcgaagtggacgggcagctcattacct
 Tggagagtggagagttccaagtatacaaaacaaagccattccgccttaacc
 Gcctttcagaccgagcaaatacaagattcggagcattccgggaagatggt
 tgcgaaaacgccagttcagaatcggcgacatagcgGGAGAACATACCGCCT
 TCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTTCAGC
 TCCGACGATGCTGGCGGAAAACCTGACCTATACCATAGATTTTCGCC**AAAAA**
 ACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAACACCCGAGCAAAATGTCG
 AGCTTGCCGCCGCCGAACCTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATT
 TTGGGCGACACGCGCTACGGCAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGC
 CCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGA
 TAGGGGAAAAGGTTACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

vaadigagladaltaplhdhkdkglsltldqsvrkneklklaaqaekty
 gngdsltngklkndkvsrfdfirqievdgqlitlesgefvykqshsalt
 afqteqiqdsehsgkmvakrqfrigdialGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFS
 SDDAGGKLTYYTIDFA**K**QGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVI
 LGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQE IAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ*

Figura 25. Secuencias de nucleótidos y proteína de la Quimera IIb (MC58/8047 A174K/K180R)

gtcgccgcccacatcggtgcggggcttgccgatgcactaacgcaccgct
 Cgaccataaagacaaaaggtttgcagctcttgacgctggatcagtcggtca
 Ggaaaaacgagaaactgaagctggcggcacaaggtgcggaaaaaacttat
 Ggaaacggtgacagcctcaatacgggcaaattgaagaacgacaaggtcag
 Ccgtttcgactttatccgccaatcgaagtggacgggcagctcattacct
 Tggagagtggagagttccaagtatacaaaacaagccattccgccttaacc
 Gcctttcagaccgagcaatacaagattcggagcattccgggaagatggt
 tgcgaaacgccagttcagaatcggcgacatagcgGGAGAACATACCGCCT
 TCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTACAGC
 TCCGACGATGCTGGCGGAAAACCTGACCTATACCATAGATTTTCGCCAAAA
 ACAGGGACACGGCAGAAATCGAACACCTGAAAACACCCGAGCAAAATGTCTG
 AGCTTGCCGCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATT
 TTGGGCGACACGCGCTACGGCAGCGAAGAAAAAAGGCACTTACCACCTCGC
 CCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGA
 TAGGGGAAAAGGTTACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

vaadigagladaltaplhdhkdqsltdqsvrkneklklaaqaekty
 gngdslntgklkndkvsrfdfirqievdgqlitlesgefvykqshsalt
 afqteqiqdsehsgkmvkrqfrigidiaGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFS
 SDDAGGKLTYYTIDFAKQGHGRIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVI
 LGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ*

Figura 26. Secuencias de nucleótidos y proteína de la Quimera III (NZ98254/8047)

gtcgccgcccacatcgggcggggcttgccgatgcactaacgcaccgct
 cgaccataaagacaaaaggtttgcagctcttgacgctggatcagtcggtca
 ggaaaaacgagaaactgaagctggcggcacaaggtgcggaaaaaacttat
 ggaaacggtgacagccttaatacgggcaaattgaagaacgacaaggtcag
 ccgtttcgactttatccgtcaaatcgaagtggacgggcagctcattacct
 tggagagcggagagttccaagtgtacaaacaagccattccgccttaacc
 gccttcagaccgagcaagaacaagatccagagcattccgggaagatggt
 tgcgaaacgccggttcaaatcggcgacatagcgGGAGAACATACCGCCT
 TCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTACAGC
 TCCGACGATGCTGGCGGAAAACCTGACCTATACCATAGATTTTCGCCGCAA
 ACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAACACCCGAGCAAAATGTCTG
 AGCTTGCCGCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATT
 TTGGGCGACACGCGCTACGGCAGCGAAGAAAAAAGGCACTTACCACCTCGC
 CCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGA
 TAGGGGAAAAGGTTACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

vaadigagladaltaplhdhkdslqsltdqsvrkneklklaaqaekty
 Gngdslntgklkndkvsrfdfirqievdgqlitlesgefvykqshsalt
 alqteqeqdpehsgkmvkrfrigidiaGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFS
 SDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVI
 LGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ*

Figura 27. Secuencias de nucleótidos y proteína de la Quimera IV (MC58/RM1090)

gtcgccgcccacatcggtgcggggcttgccgatgcactaaccgcaccgct
 cgaccataaagacaaaaggtttgcagctcttgacgctggatcagtcggtca
 ggaaaaacgagaaactgaagctggcggcacaaggtgcggaaaaaacttat
 ggaaacggtgacagcctcaatcgggcaaattgaagaacgacaaggtcag
 ccgtttcgactttatccgccaatcgaagtggacgggcagctcattacct
 tggagagtggagagttccaagtatacaacaaagccattccgccttaacc
 gcctttcagaccgagcaaatacaagattcgggagcattccgggaagatggg
 tgcgaaacgccagttcagaatcggcgacatagcgGGAGAACATACCGCCT
 TCAACCAACTGCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTACAGC
 TCCGACGACCCGAACGGCAGGCTGCACTACTCCATTGATTTTACCAAAAA
 ACAGGGTTACGGCAGAATCGAACACCTGAAAACGCCCGAGCAGAATGTCG
 AGCTTGCCTCCGCCGAAC TCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATT
 TTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGC
 CCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGA
 TAAGGGAAAAGGTTACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

vaadigagladaltapl dhkdkgls ltdqsvrkneklklaaggaekty
 Gngdslntgklkndkvsrfdfirqievdgqlit lesgefvykqshsalt
 afqteqiqdsehsgkmvakrrqfrigidiaGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFS
 SDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVI
 LGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ*

Figura 28. Secuencias de nucleótidos y proteína de la Quimera V (NZ98254/RM1090)

gtcgccgcccacatcggtgcggggcttgccgatgcactaaccgcaccgct
 cgaccataaagacaaaaggtttgcagctcttgacgctggatcagtcggtca
 ggaaaaacgagaaactgaagctggcggcacaaggtgcggaaaaaacttat
 ggaaacggcgacagccttaatcgggcaaattgaagaacgacaaggtcag
 ccgtttcgactttatccgtcaaattcgaagtggacgggcagctcattacct
 tggagagcggagagttccaagtgtacaaacaaagccattccgccttaacc
 gcccttcagaccgagcaagaacaagatccagagcattccgggaagatggg
 tgcgaaacgccggttcaaatcggcgacatagcgGGAGAACATACCGCCT
 TCAACCAACTGCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTACAGC
 TCCGACGACCCGAACGGCAGGCTGCACTACTCCATTGATTTTACCAAAAA
 ACAGGGTTACGGCAGAATCGAACACCTGAAAACGCCCGAGCAGAATGTCG
 AGCTTGCCTCCGCCGAAC TCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATT
 TTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGC
 CCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGA
 TAAGGGAAAAGGTTACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

Vaadigagladaltapl dhkdkslqsltdqsvrkneklklaaggaekty
 Gngdslntgklkndkvsrfdfirqievdgqlit lesgefvykqshsalt
 alqteqeqdpehsgkmvakrrfrigidiaGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFS
 SDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVI
 LGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ*

Figura 29

Anticuerpo (inmunógeno)	Residuo/s reactivo/s ¹	Cepa/s no reactiva/s	Residuo/s no reactivo/s	Prueba
(v.1 de MC58)				
JAR 1	R204	M6190	H204	KO
JAR 3	G121 y K122	M6190 y 03S-0408	R121 o S122	KO, KI
JAR 5	G121 y K122	M6190 y 03S-0408	R121 o S122	KO, KI
(v.2 de 2996)				
JAR 10	K180 y E192	M1239	R180 o D192	KO, KI
JAR 11	A174	M1239	K174	KO
JAR 13	S216	RM1090	G216	KO, KI
(v.3 de M1239)				
JAR 32	K174	8047	A174	KO, KI
JAR 33	R180 y E192	8047	K180 o D192	KO, KI
JAR 35	K174	8047	A174	KO, KI
¹ Resto reactivo de fHBP procedente de la cepa usada como fuente de inmunización. Para los mAb anti-v.2, la cepa reactiva es 8047, cuya fHBP es un 99,6 % idéntica a la de la cepa 2996. ² JAR 1, 3, 5, 13, 32 y 35 inhibieron la unión de fH a la fHBP por ELISA y JAR 11 y 36 dieron inhibición parcial de la unión de fH. JAR 10 y 33 no inhibieron la unión de fH (véase la Fig. 19).				

Figura 30.

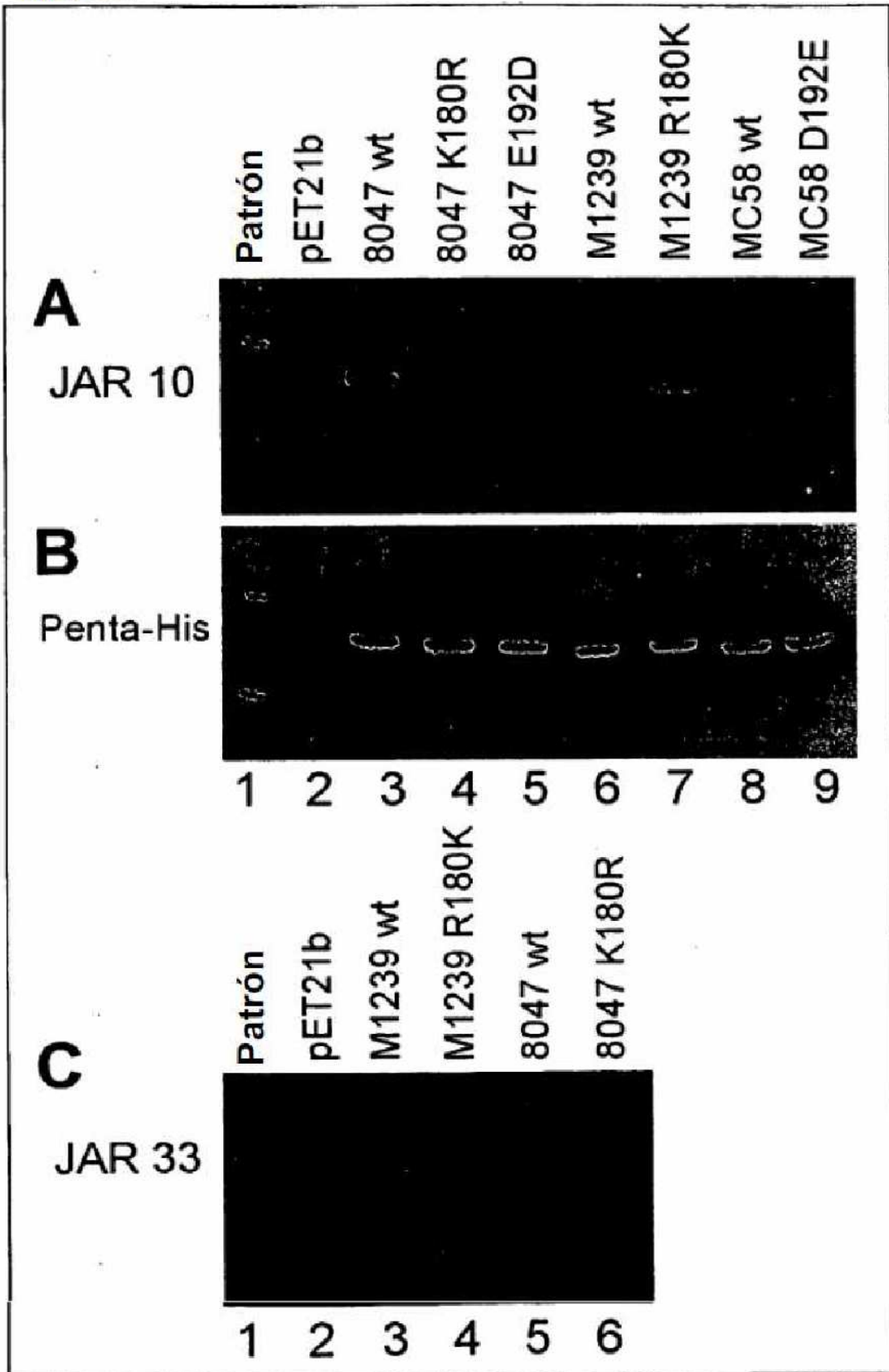


Figura 31.

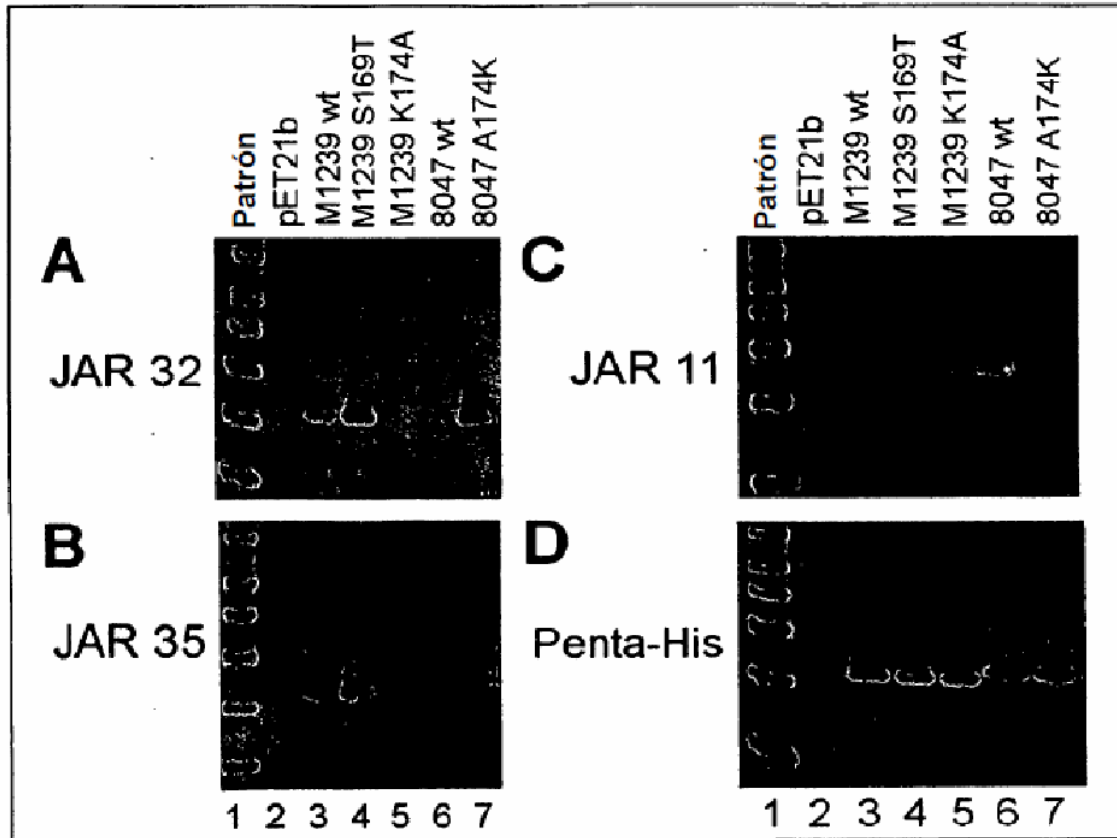


Figura 32.

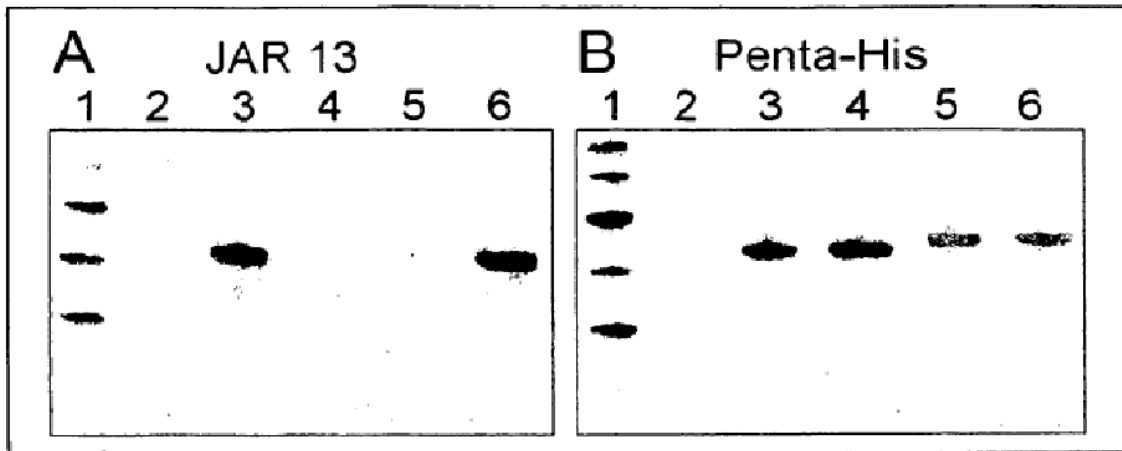


Figura 33.

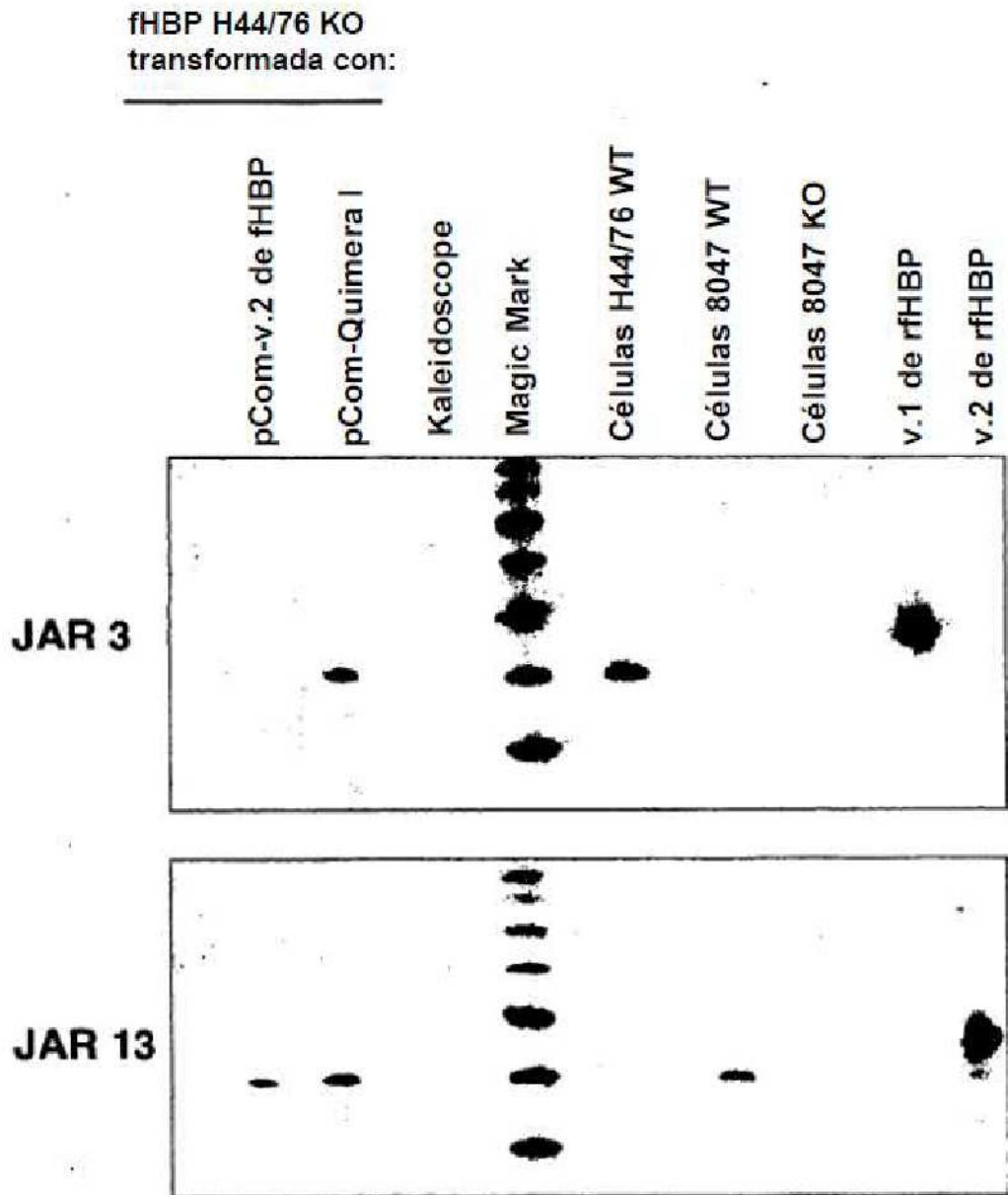


Figura 34

