

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 362**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/22** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2002 E 10005685 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2248822**

54 Título: **Adhesinas de meningococos**

30 Prioridad:

**27.07.2001 GB 0118401**

**06.09.2001 GB 0121591**

**14.05.2002 GB 0211025**

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

**06.06.2017**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)**

**Rue de l'Institut 89**

**1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**ARICO, MARIA y**

**COMANDUCCI, MAURIZIO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 615 362 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

Adhesinas de meningococos

**Campo de la técnica**

5 La presente invención se incluye en el campo de la bioquímica y, en particular, de la bioquímica de las bacterias patógenas en el género *Neisseria* (por ejemplo, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*).

**Técnica anterior**

10 Las solicitudes de patente internacional WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280 y WO00/22430 divulgan proteínas de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*. Se ha publicado la secuencia completa del genoma de *N. meningitidis* de serogrupo B [Tettelin y col., (2000) Science 287:1809–1815] y se ha sometido a análisis con el fin de identificar antígenos de la vacuna [Pizza y col., (2000) Science 287:1816–1820]. En el documento WO01/64922 se divulgan enfoques de la expresión de las proteínas. La secuencia completa del genoma de *N. meningitidis* del serogrupo A también se conoce [Parkhill y col., (2000) Nature 404:502–506].

15 No obstante, los datos de secuencia solos no revelan todo acerca de este patógeno. Los objetos de la presente invención incluyen: (a) proporcionar maneras de intervenir en la bioquímica de *Neisseria*; (b) proporcionar nuevos usos para proteínas conocidas de *Neisseria*; (c) proporcionar formas alternativas y mejoradas de proteínas conocidas de *Neisseria*, tales como formas enzimáticamente inactivas de proteínas conocidas o productos proteolíticos de proteínas conocidas; y (d) proporcionar materiales útiles para el estudio y la modulación de la adhesión de *Neisseria*.

**Divulgación de la invención****20 Nomenclatura usada en el presente documento**

'ORF40' se da a conocer en el ejemplo 1 del documento WO99/36544. Se divulgan las secuencias de los serogrupos A y B de *N. meningitidis* (SEQ ID 1 a 6 en el mismo). Otras formas de la proteína se divulgan en los documentos WO99/3113 y WO99/58683 y también se pueden encontrar en GenBank (véanse los números de acceso gi: 11352902, 7228562, 14578015, 12958107, 7228586, 7228572, 7228594, 7228588, 14578013, 7228568, 7228546, 7228548, 7228592, 14578009, 7228558, 7228600, 7228596, 7228542, 7228574, 7228552, 7228554, 14578023, 14578021, 11354080, 7228584 y 7228590).

30 'App' (proteína adhesión y penetración) se da a conocer como 'ORF1' en el ejemplo 77 del documento WO99/24578. Se divulgan secuencias de los serogrupos A y B de *N. gonorrhoeae* (SEQ ID 647 a 654). Otras formas de la proteína se divulgan en el documento WO99/55873 y también se pueden encontrar en GenBank (véanse los números de acceso gi: 11280386, 7227246, 11071865, 6977941, 11071863, 11280387, 7379205).

La proteína "NadA" (adhesina A de *Neisseria*) del serogrupo B de *N. meningitidis* se divulga como proteína "961" en el documento WO99/57280 (SEQ ID 2943 y 2944) y como 'nmb1994' de Tettelin y col., (véanse los números de acceso en GenBank: 11352904 y 7227256) y en la figura 9 en el presente documento.

35 Estas proteínas se expresan, preferentemente, que no sea como una proteína de fusión (por ejemplo, sin GST, MBP, cola de His o similar).

40 En general, la referencia a cualquier proteína particular incluye proteínas que comparten una identidad de secuencia con una de las secuencias divulgadas anteriormente. El grado de "identidad de secuencia" es, preferentemente, mayor que 50 % (por ejemplo, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más). Esto incluye mutantes y variantes alélicas. En el contexto de la presente invención, la identidad de secuencia se determina, preferentemente, mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman que se implementa en el programa MPCRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de hueco afin con parámetros de penalización por apertura de hueco = 12 y penalización por extensión de hueco = 1. Normalmente, se considera una identidad del 50 % o más entre dos proteínas como una indicación de equivalencia funcional.

45 Las convenciones de nombres utilizados en los documentos WO99/24578, WO99/36544 y WO99/57280 también se utilizan en la presente documento (por ejemplo, 'OF4', 'ORF40', 'ORF40-1' etc., tal como se utiliza en los documentos WO99/24578 y WO99/36544; 'm919', 'g919' y 'a919' etc. tal como se utiliza en el documento WO99/57280).

**Proteínas de adhesión**

50 En ejemplo 22 de la solicitud de patente internacional WO01/64922 se divulga que *E. coli* que expresa la proteína NadA puede adherirse a las células epiteliales humanas. Esta actividad de adhesión se ha estudiado además la actividad de adhesión y también se ha encontrado para App y ORF40.

*Alelos de NadA*

La invención proporciona una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o 5 que carece del péptido líder en N terminal de las SEQ ID NO: 2 o 5 y que carece del anclaje de la membrana en C terminal de las SEQ ID NO: 2 o 5.

5 La invención también proporciona una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene en toda su longitud al menos x % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 5, que carece del péptido líder en N terminal de las SEQ ID NO: 2 o 5 y que carece del anclaje de la membrana en C terminal de las SEQ ID NO: 2 o 5. El valor de x es al menos 95 % (por ejemplo, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más). Esto incluye variantes, por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, mutantes etc.

10 La invención proporciona una proteína que consiste en un fragmento de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o 5 que carece del péptido líder en N terminal de las SEQ ID NO: 2 o 5 y que carece del anclaje de la membrana en C terminal de las SEQ ID NO: 2 o 5. Estos deben comprender al menos n nucleótidos consecutivos a partir de una o más de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 5, en las que n es 200 o más (por ejemplo, 250, 300, 350 o más). El fragmento puede comprender una secuencia que es común a las SEQ ID 2 y 5, o puede comprender una secuencia que no es común a las SEQ ID 2 y 5.

15 Los fragmentos preferidos comprenden uno o más epítomos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 5. Otros fragmentos son (a) los péptidos líder en N-terminal de SEQ ID 1 a 14, (b) las SEQ ID 1 a 14, pero sin k resto o restos de aminoácidos en N-terminal, en las que k es 1 o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 etc.), y (c) las SEQ ID 1 a 14, pero sin l resto o restos de aminoácidos en C-terminal, en las que l es 1 o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 etc.). Los fragmentos definidos en las reivindicaciones están comprendidos en (b) y (c) es decir, truncamiento en ambos extremos, C y N.

20 Los fragmentos dentro de la categoría (b) como se define en las reivindicaciones carecen del péptido líder en N-terminal. Para las SEQ ID 1, 2, 3, 7, 9, 11 y 13, el valor de k es, por lo tanto, 23; para la SEQ ID 5, el valor de k es 25. Los fragmentos dentro de la categoría (c) tal como se definen en las reivindicaciones carecen del anclaje a la membrana en C-terminal. Por tanto, el valor de l es 54. Se pueden usar variantes menores de esta delección en C-terminal (por ejemplo, donde l es 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66).

25 La proteína de la invención puede incluir la secuencia héptada  $(AA_1AA_2AA_3AA_4AA_5AA_6AA_7)_r$ , en la que: AA<sub>1</sub> es Leu, Ile, Val o Met; cada uno de AA<sub>2</sub> AA<sub>3</sub> AA<sub>4</sub> AA<sub>5</sub> AA<sub>6</sub> y AA<sub>7</sub> pueden ser independientemente cualquier aminoácido; r es un número entero de 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 etc.). Donde r es 2 o más, el significado de cada AA<sub>1</sub> AA<sub>2</sub> AA<sub>3</sub> AA<sub>4</sub> AA<sub>5</sub> AA<sub>6</sub> y AA<sub>7</sub> puede ser igual o diferente en cada una de las repeticiones de la héptada r. La héptada o héptadas pueden formar un dominio en cremallera de leucina.

30 Las proteínas de la invención se pueden preparar de muchas maneras por ejemplo mediante síntesis química (al menos en parte), mediante digestión de polipéptidos más largos que utilizan proteasas, mediante la traducción del ARN, mediante purificación a partir de cultivo celular (por ejemplo, de expresión recombinante), a partir del propio organismo (por ejemplo, aislamiento a partir de tejido de próstata), de una fuente de línea celular, etc.

Las proteínas de la invención se pueden preparar en diversas formas por ejemplo, nativa, fusiones, glicosilada, no glicosilada, lipidada, no lipidada etc.

La proteína está, preferentemente, en forma de un oligómero.

Las proteínas de la invención pueden estar fijadas o inmovilizadas sobre un soporte sólido.

40 Las proteínas de la invención pueden comprender un marcador detectable, por ejemplo un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o un marcador de biotina. Esto es particularmente útil en técnicas de inmunoensayo.

Las proteínas de la invención están, preferentemente, en forma aislada o sustancialmente aislada.

45 En general, las proteínas de la invención se proporcionan en un ambiente no natural, por ejemplo se separan de su ambiente natural. En ciertas realizaciones, la proteína objeto está presente en una composición que está enriquecida para la proteína en comparación con un control. Como tal, se proporciona la proteína purificada, con purificado se quiere decir que la proteína está presente en una composición que está sustancialmente libre de otras proteínas expresadas, de modo que, con sustancialmente libre se quiere decir que menos del 90 %, normalmente menos del 60 % y, más normalmente, menos del 50 % de la composición está hecho de otras proteínas expresadas.

50 El término "proteína" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También incluidos dentro de la definición están, por ejemplo, las proteínas que contienen uno o más análogos de un

aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Las proteínas se pueden producir en forma de cadenas sencillas o cadenas asociadas.

5 Los mutantes pueden incluir sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras o sustituciones para eliminar aminoácidos no esenciales de modo que alteran un sitio de glicosilación, un sitio de fosforilación o un sitio de acetilación, o para minimizar el plegamiento erróneo mediante sustitución o deleción de uno o más restos de cisteína que no son necesarios para el funcionamiento. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquéllas que conservan la carga general, la hidrofobicidad/hidrofilicidad y/o el volumen estérico del aminoácido sustituido. Se pueden diseñar variantes de modo que conserven o tengan mayor actividad biológica de una región concreta del polipéptido (por ejemplo, un dominio funcional y/o, cuando el polipéptido es un miembro de una familia de polipéptidos, una región asociada con una secuencia consenso). La selección de alteraciones de aminoácidos para la producción de variantes se puede basar en la accesibilidad (interior frente a exterior) del ácido amino, la termoestabilidad del polipéptido variante, los puentes disulfuro deseados, los sitios de unión a metal deseados etc.

15 La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de la invención como se ha definido anteriormente. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar en reacciones de hibridación (por ejemplo, transferencias de tipo Northern o Southern, o en micromatrices de ácido nucleico o "chips génicos") y en reacciones de amplificación (por ejemplo, PCR, SDA, SSSR, LCR, TMA, NASBA, etc.) y en otras técnicas de ácido nucleico.

20 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar de muchas maneras, por ejemplo mediante síntesis química, en todo o parte, mediante digestión de polinucleótidos más largos usando las nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, a partir de la propia bacteria, etc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden tomar varias formas, por ejemplo monocatenarios, bicatenarios, vectores, marcados, no marcados etc.

Los ácidos nucleicos de la invención están, preferentemente, en forma aislada o sustancialmente aislada.

25 La expresión "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen armazones modificados, y también ácidos nucleicos peptídicos (PNA) etc.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención se puede marcar con, por ejemplo, un marcador radioactivo o fluorescente. Esto es particularmente útil cuando el ácido nucleico se va a utilizar en las técnicas de detección de ácidos nucleicos.

30 La invención también proporciona vectores que comprenden secuencias de nucleótidos de la invención (p. ej., vectores de clonación o expresión, tales como los adecuados para inmunización con ácido nucleico).

### **Inmunización**

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende (a) una proteína NadA de Neisseria, como se define en las reivindicaciones y /o (b) ácido nucleico que codifica una proteína NadA como se define en las reivindicaciones.

35 La invención también proporciona una composición inmunogénica de la invención para su uso en la protección de un mamífero contra una infección por Neisseria.

La invención también proporciona la proteína NadA de Neisseria para su uso como un medicamento como se define en las reivindicaciones.

40 La invención también proporciona el uso de una proteína NadA en la fabricación de un medicamento para la prevención de infección por Neisseria en un mamífero, tal como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona el uso de ácido nucleico que codifica una proteína NadA en la fabricación de un medicamento para la prevención de infección por Neisseria en un mamífero, tal como se define en las reivindicaciones.

Preferentemente, el mamífero es un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o, preferentemente, un niño.

45 La proteína NadA es como se define en las reivindicaciones (véase anteriormente). La proteína NadA está, preferentemente, en forma de un oligómero (por ejemplo, un dímero, trímero, tetrámero o superior). Los anticuerpos contra las proteínas nada de las SEQ ID de 1 a 12 son bactericidas en los distintos alelos hipervirulentos. Cuando se desea una respuesta inmunitaria contra una cepa NadA<sup>+</sup> no hipervirulenta, sin embargo, las SEQ ID 13 y 14 son útiles. Por supuesto, también son posibles mezclas de NadA, en particular mezclas que contienen más de un alelo de NadA.

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

Los usos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento /la protección contra las infecciones de *Neisseria meningitidis*, serogrupos A, B y C. Son particularmente útiles contra cepas de *N. meningitidis* de linajes hipervirulentos ET-5, EY-37 y el clúster A4.

5 Los usos son particularmente útiles para la prevención/tratamiento de enfermedades incluidas, entre otras, meningitis (particularmente meningitis bacteriana) y bacteriemia.

La eficacia del tratamiento terapéutico se puede analizar monitorizando la infección por *Neisseria* tras la administración de la composición de la invención. La eficacia del tratamiento profiláctico se puede analizar monitorizando las respuestas inmunitarias contra NadA tras la administración de la composición.

10 La composición de la invención puede comprender adicionalmente un antígeno que, cuando se administra a un mamífero, provoca una respuesta inmunitaria que es protectora contra una cepa de linaje III de *N. meningitidis*.

En general, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir mediante inyección parenteral (p. ej. por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido) o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural o pulmonar.

15 La invención se puede usar para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa.

La posología del tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis.

20 Generalmente, la composición inmunogénica de la invención incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable que puede ser cualquier sustancia que no induzca por sí sola la producción de anticuerpos perjudiciales para el paciente que recibe la composición y que se puede administrar sin toxicidad indebida. Vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y partículas de virus inactivos. Tales vehículos son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables se pueden incluir líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. En dichos vehículos también puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tampón del pH y similares.

25 Los liposomas son vehículos adecuados. Una discusión a fondo de los vehículos farmacéuticos está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.

30 Las infecciones con *Neisseria* afectan a varias zonas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención se pueden preparar de varias maneras. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar en forma de inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La composición se puede preparar para administración tópica, por ejemplo en forma de un ungüento, crema o polvo. La composición se puede preparar para administración oral, por ejemplo en forma de un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para administración pulmonar, *por ejemplo* en forma de un inhalador, usando un polvo fino o un atomizador. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o

35 pesario. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular, *por ejemplo* en forma de gotas.

Preferentemente, la composición es estéril. Preferentemente es apirógena. Preferentemente, está tamponada a, por ejemplo, entre pH 6 y pH 8, generalmente aproximadamente a un pH de 7.

40 Las composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de inmunógeno, así como de cualquier otro componente especificado, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se quiere decir que la administración de dicha cantidad a un individuo, bien en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía en función de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (p. ej., primate no humano, primate etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico encargado del tratamiento de la situación médica y otros factores

45 relevantes. Cabe esperar que la cantidad entre dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina. La dosis de tratamiento puede ser un programa de una única dosis o un programa de varias dosis (por ejemplo, que incluye dosis de refuerzo). La composición puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

50 La composición inmunogénica también incluir un adyuvante. Entre los adyuvantes preferidos para potenciar la eficacia de la composición se incluyen, entre otros: (A) compuestos de aluminio (por ejemplo un hidróxido de aluminio, tal como oxihidróxido, o un fosfato de aluminio, tal como hidroxifosfato u ortofosfato, sulfato de aluminio etc.), o mezclas de diferentes compuestos de aluminio, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa etc.) y prefiriéndose la adsorción; (B) MF59 (5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80 y 0,5 % de Span 85, formulados en partículas submicrónicas usando un microfluidificador); (C) liposomas; (D) ISCOM, que pueden estar desprovistas de detergente adicional; (E) SAF, que contiene 10 % de escualano, 0,4 % de Tween 80, 5 % de polímero de bloque-pluronic L121, y thr-MDP, microfluidificador en una emulsión submicrónica o agitado en vórtex para generar una emulsión de tamaño de particular mayor; (F) sistema adyuvante Ribit<sup>TM</sup> (RAS), (Ribit

55

Immunochem) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforolípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y el esqueleto de la pared celular (EPC), preferentemente MPL + EPC (Detox™); (G) adyuvantes de saponina, tales como QuilA o QS21, también conocido como Stimulon™; (H) chitosano; (I) adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF); (J) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- $\gamma$ ), factor estimulante de las colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc.; (K) micropartículas (es decir, una particular de ~100 nm a ~150  $\mu$ m de diámetro, más preferentemente ~200 nm to ~30  $\mu$ m de diámetro y, lo más preferentemente, de ~500 nm a ~10  $\mu$ m de diámetro) formado a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona etc.); (L) monofosforilo lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL); (M) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua; (N) oligonucleótidos que comprenden motivos de CpG, es decir que contienen al menos un dinucleótido CG, usándose, opcionalmente, 5-metilcitosina en lugar de citosina; (O) un polioxietiléneter o polioxietilénéster; (P) un éster de polioxietilensorbitán en combinación con un tensioactivo éter o éster alquílico de octoxinol o de polioxietileno o en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como octoxinol; (Q) un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) y una saponina; (R) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica; (S) una saponina y una emulsión de aceite en agua; (T) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroles); (U) enterotoxina termolábil de *E. coli* ("LT"), o mutantes destoxificados de la misma, tales como los mutantes K63 o R72; (V) toxina del cólera ("CT"), o mutantes destoxificados de la misma; (W) micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150  $\mu$ m de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30  $\mu$ m de diámetro y, más preferentemente, de ~500 nm a ~10  $\mu$ m de diámetro) formadas por materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), tal como poli(lactida-co-glicólido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona etc.); y (X) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Sales de aluminio (fosfatos de aluminio y, particularmente hidroxifosfatos y/o hidróxidos y, en particular, oxihidróxido) y MF59 son adyuvantes preferidos para inmunización parenteral. Los mutantes de toxina son adyuvantes mucosos preferidos.

Péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina MTP-PE), etc.

Las composiciones de la invención pueden comprender antígenos (por ejemplo, antígenos protectores contra *N. meningitidis* o contra otros organismos), además de a NadA, por ejemplo, antígenos DTP, antígeno Hib etc.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden usarse terapéuticamente (es decir, para tratar una infección existente) o profilácticamente (es decir, para prevenir una infección futura). La inmunización terapéutica es particularmente útil para el tratamiento de la infección por *Candida* en sujetos inmunocomprometidos.

Como alternativa al uso de antígenos proteicos en las composiciones inmunogénicas de la invención se puede usar el ácido nucleico que codifica el antígeno (preferentemente ADN, por ejemplo en forma de un plásmido).

#### Exención de responsabilidades

La invención excluye preferentemente: (a) secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos disponibles en bases de datos públicas de secuencias (por ejemplo, GenBank o GENESEQ) antes al 26 de julio de 2002 y, más preferentemente, antes al 27 de julio de 2001; (b) secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos divulgadas en las solicitudes de patentes que tengan una fecha de presentación o, en su caso, una fecha de prioridad anterior al 26 de julio de 2002 y, más preferentemente, anterior al 27 de julio de 2001. En particular, pueden excluirse las entradas de SEQ ID en las siguientes solicitudes de patente: WO99/24578; WO99/36544; WO99/57280; WO00/22430; WO00/66741; WO00/66791; WO00/71574; WO00/71725; WO01/04316; WO01/31019; WO01/3786 WO01/38350; WO01/52885; WO01/64920; WO01/64922.

#### Definiciones

El término "que comprende" significa "que incluye" además de "constituido por", por ejemplo una composición "que comprende" X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

#### Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 a 3 muestran los datos de expresión para (1) ORF40 (2) App (3) NadA.  
Las figuras 4-6 muestran el análisis FACS de las proteínas implicadas en la adhesión a las células humanas. En las figuras 4 y 5 (Figura 6), los datos corresponden, de izquierda a derecha, a ORF40 ( $\blacktriangle$ ), App ( $\bullet$ ), Nada ( $\diamond$ ) y GNA2132 ( $\square$ ).  
Las figuras 7 y 8 muestran homologías de (7) ORF40 y (8) App.  
La figura 9 muestra una alineación de los alelos Nada, y la figura 10 muestra la relación de los alelos 1 a 3.  
La figura 11 muestra la estructura secundaria predicha para NadA.  
La figura 12 muestra el análisis de las secuencias aguas arriba y aguas abajo de NadA.

- La figura 13 muestra el análisis de PCR de la expresión de NadA en diferentes cepas de *N. meningitidis*.  
 La figura 14 muestra el análisis de inmunotransferencia de la expresión de NadA en diferentes cepas de *N. meningitidis*.  
 La figura 15 muestra la variación de la expresión NadA con el tiempo de cultivo.  
 5 La figura 16 muestra el análisis FACAS de NadA de células de *N. meningitidis* isogénicas encapsuladas y no encapsuladas.  
 La figura 17 muestra los resultados de inmunofluorescencia obtenidos utilizando células anti-NadA contra las células de Chang (17A a 17C) o células HeLa (17D).  
 La figura 18 muestra los resultados de inmunofluorescencia obtenidos utilizando células anti-NadA contra las  
 10 células de Chang después de incubación a (A) 37 °C o (B) 4 °C.  
 La figura 19 muestra los resultados de inmunofluorescencia para las células de Chang tratadas con saponina.  
 La figura 20 muestra los resultados de inmunofluorescencia obtenidos utilizando monocitos.  
 La figura 21 muestra los resultados de inmunofluorescencia obtenidos utilizando macrófagos.  
 La figura 22 muestra la secreción de IL- $\alpha$  por los monocitos en respuesta al tratamiento con NadA.  
 15 La figura 23 muestra el efecto de anti-CD 14 sobre la secreción de IL- $\alpha$  por los monocitos.  
 La figura 24 muestra los resultados de inmunofluorescencia obtenidos utilizando anti-NadA contra *E coli* transformada para expresar NadA.  
 La figura 25 muestra la tinción de *E coli* transformada usando (A) anti-Nada (B) anti-*E coli* o (C) ambos.  
 La figura 26 es una representación esquemática de las características de App. Se indican el péptido líder en N-terminal, el dominio pasajero y el  $\beta$ -dominio en C-terminal. Se muestran las posiciones del sitio activo para la serina proteasa, el sitio de unión a ATP /GTP, los dos sitios ricos en arginina y la región rica en prolina. En BOX 1, se muestran los sitios de escisión. En BOX 2 se muestra una comparación de los sitios proteolíticos conocidos de diferentes autotransportadores y se obtiene una firma consenso. Las flechas identifican las escisiones; X = cualquier aminoácido; hid = restos hidrófobos; (A, S) = alanina o serina  
 20 La figura 27 es una representación esquemática de las construcciones utilizadas para el estudio de App.  
 La figura 28 muestra una transferencia Western de la membrana externa y las proteínas extracelulares en *E coli*.  
 La figura 29 muestra el análisis FACS de la membrana externa y las proteínas extracelulares en *E coli*.  
 La figura 30 muestra la inmunofluorescencia de la membrana externa y las proteínas extracelulares en *E coli*.  
 La figura 31 muestra las proteínas totales de *E. coli* analizadas mediante SDS-PAGE.  
 25 La figura 32 muestra una inmunotransferencia de sobrenadantes de cultivo precipitado en bruto utilizando antisuero de ratón contra APP-his.  
 La figura 33 muestra los datos de adhesión de FACS utilizando antisuero de conejo contra *E coli*. Los porcentajes de células positivas a la adhesión se muestran cerca de los perfiles de fluorescencia.  
 La figura 34 muestra datos de microscopia de inmunofluorescencia que muestran adhesión y agregación bacteriana.  
 30 La figura 35 muestra la unión dependiente de la concentración de App-His ( $\blacklozenge$ ), App $\alpha$ -His ( $\blacksquare$ ) y NMB2132 ( $\blacktriangle$ ) expresada como la intensidad de fluorescencia media (IFM) neta.  
 La figura 36 muestra el efecto sobre la unión de App-His (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de preincubación con pronasa (columnas de la izquierda) o de fosfolipasa A2 (columnas de la derecha) con concentraciones crecientes de la enzima. La pronasa se analizó a 0, 250, 500, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; la fosfolipasa A2 se analizó a 0, 50, 200, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .  
 35 La figura 37 es una comparación de la especificidad de la unión celular de la proteína App-His a 100, 25 o de 6,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  contra varias células diferentes.  
 La figura 38 muestra la asociación de bacterias *N. meningitidis* MC58 de tipo silvestre o defectuosas en App.  
 La figura 39 muestra un análisis de transferencia Western de lisados totales de *Meningitidis* MC58 cosechados a 0,5 o 0,8 DO<sub>620nm</sub>. Las calles 1 y 3 muestran MC58 de tipo silvestre y las calles 2 y 4 muestran las defectuosas en App.  
 40 La figura 40 muestra un análisis de transferencia Western de sobrenadantes en paralelo a la figura 39.

## Ejemplos

### Homología de NadA

- 50 NadA muestra homología con (a) YadA de *Yersinia enterocolitica*, una adhesina no asociada a *pilus* implicada en la virulencia [Cornelis (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1315–1352.] y (b) UspA2 de *Moraxella catarrhalis*, una proteína implicada en la resistencia al suero y un antígeno protector [Chen y col., (1999) Infect. Immun. 67:1310–1316.]. La similitud de secuencia se agrupa principalmente en la región carboxilo terminal (56-63 % de identidad en los últimos 70 aminoácidos). Fuera de esta región el nivel de identidad desciende a 23–25 %.
- 55 YadA y UspA2 se han identificado como adhesinas [Hoiczky y col., (2000) EMBO J 19:5989–5999]. Ambas proteínas forman oligómeros de alto peso molecular (150 a 200 kDa) estables y difíciles de disociar anclados a la membrana externa. También se ha descubierto que NadA forma agregados de alto peso molecular muy estables en la membrana externa de meningococo.
- 60 Se analizó la secuencia de aminoácidos de NadA [Nielsen y col., (1997) Protein Engineering 10:1–6; Levin y Garner (1988) Biochim. Biophys. Acta 955:283–295; Berger y col., (1995) PNAS USA 92:8259–8263; Bornberg-Bauer y col., (1998) Nucleic Acids Res. 26:2740–2746]. El análisis de la estructura secundaria se muestra en la Figura 11. Se indican el extremo N globular y el extremo C antipático terminal y C-terminal anfipáticos, así como las posiciones del

péptido líder (PL) y un anclaje a la membrana. La región carboxilo terminal (aa 310-362) tiene una estructura  $\beta$  anfipática predicha (hebras  $\beta$  que se muestran en negro) y un aminoácido aromático terminal, que son características típicas de los dominios de anclaje a la membrana exterior. La región amino terminal (aa 23-90) no tiene una estructura secundaria definida, pero el resto de la proteína tiene principalmente propensión a formar  $\alpha$ -hélice (84,6 %). Dentro de esta región, los restos 90-146 y 183-288 tienen una alta probabilidad de formar hélices superenrolladas. Además, los restos 122-143 contienen cuatro restos de leucina en las posiciones "a" de las repeticiones en héptada (L-x(6)-L-x(6)-L-x(6)-L) que pueden formar un dominio de cremallera de leucina (••••). Se sabe que tanto las hélices superenrolladas como las secuencias de la cremallera de leucina están implicadas en la dimerización y pueden participar en la oligomerización de monómeros a través de la asociación de dos o más hélices alfa.

A pesar de que la similitud estructura primaria entre NadA, YadA y UspA2 está agrupada en el extremo C, la similitud general entre las tres proteínas se conserva a nivel de la estructura secundaria. Las supuestas cremalleras de leucina están presentes tanto en NadA como en UspA2. NadA, YadA and UspA2 tienen un anclaje a la membrana en carboxilo terminal formado por cuatro hebras  $\beta$  anfipáticas y una región interna  $\alpha$ -helicoidal con propensión a formar hélices superenrolladas. En YadA y UspA2, se ha demostrado que estas  $\alpha$ -hélices forman regiones de hélices superenrolladas que participan en la oligomerización de monómeros [Hoiczky y col., (2000) EMBO J 19:5989-5999; Cope y col., (1999) J. Bacteriol. 181:4026-4034].

La ausencia de restos de cisteína en las formas maduras de NadA es otra característica compartida con sus homólogos.

### **El ambiente genómico de NadA**

La región de codificación de *nadA* de 1086 pb está flanqueada en el extremo 3' de una secuencia de terminación, mientras que en extremo 5' (Figura 12A) muestra un supuesto sitio de unión a ribosomas (RBS; 5' AAGG-3') y una supuesta región promotora situada a 8 y 47 pares de bases, respectivamente, aguas arriba del codón de iniciación ATG.

130 pb aguas arriba de la región de codificación hay nueve repeticiones del tetranucleótido TAAA (sombreado negro en la Figura 12A), precedidas por un segundo supuesto promotor con regiones -10 y -35. Debido a la presencia de las repeticiones TAAA, el gen se había incluido como uno de los que pueden someterse a variación de fase, a pesar de que las repeticiones no están en la región de codificación [Tettelin y col.]. El gen homólogo *UspA2* tiene una repetición de tetranucleótido (AGAT) situada en la misma posición que en *nadA*, que varía en cepas diferentes [Cope y col., (1999) J. Bacteriol. 181:4026-4034].

El contenido de G + C del gen *nadA* y su región aguas arriba es menor que el promedio (45 % frente a un promedio del resto del genoma, 51,5 %), lo que sugiere la adquisición del gen por transferencia horizontal.

El gen NadA y su región aguas arriba no están presentes en la secuencia publicada del genoma de la cepa Z2491 del serogrupo A [Parkhill y col., (2000) Nature 404:502-506]. En el genoma MenA, una secuencia corta de 16 nucleótidos sin homologías en la base de datos, reemplaza el gen *nadA* (Figura 12B), mientras que los genes aguas arriba y aguas abajo (nmb1993 y nmb1995) están bien conservados (91 % y % de identidad 97). El análisis de las secuencias inmediatamente adyacentes a la región *nadA* y ausente en la cepa A del serogrupo Z2491 muestra que el segmento está flanqueado por las repeticiones directas TCAGAC. Esto puede indicar un mecanismo de recombinación. En la cepa A, el tramo de 16 nucleótidos ha interrumpido un par de repeticiones TCAGAC que lo flanquean.

### **Variación en el genotipo de NadA**

Dada la diferencia en la expresión de *nadA* entre los serotipos A y B, se eligieron 175 cepas diferentes de *N. meningitidis* para el análisis, 150 aislados representativos de los cinco serogrupos asociados a enfermedad (A, B, C, Y y W-135) y 25 cepas aisladas de portadores sanos. El análisis también incluyó una cepa de cada una de *N. gonorrhoeae*, *N. cinerea* y *N. lactamica*.

Las bacterias se cultivaron durante la noche a 37 °C en atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire en agar de medio para gonococos (GC) (Difco) suplementado con solución de suplemento de Kellogg (D-glucosa 0,22 M, L-glutamina 0,03 M, nitrato férrico 0,001 M y cocarboxilasa 0,02 M) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Mo.) como se ha descrito anteriormente [Knapp y col., (1988) Antimicrob. Agents Chemother. 32:765-767; Roberts y col., (1977) J. Bacteriol. 131:557-563]. Un asa de siembra con bacterias se disolvió en 500  $\mu$ l de PBS y el ADN cromosómico se preparó como se ha descrito anteriormente [Tinsley y col., (1996) PNAS USA 93:11109-11114].

Las bacterias se seleccionaron mediante PCR y /o hibridación de transferencia de puntos.

Se realizó amplificación por PCR de los genes *nadA* en 10 ng de ADN cromosómico utilizando cebadores, mapeo de 350 nt aguas arriba y aguas abajo de la región de codificación (cebador directo: SEQ ID 16; cebador inverso: SEQ ID 17), y polimerasa Platinum Hifi Taq (GIBCO). Las condiciones de la PCR fueron: 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 60 °C durante 30 segundos y extensión a 68 °C durante 1 minuto. Los



productos de la PCR se analizaron en gel de agarosa al 1 % y los tamaños se determinaron utilizando un marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (GIBCO). Los fragmentos amplificados se purificaron en una columna Qiaquick (Qiagen) y después secuenciaron en ciclos automáticos (Applied Biosystems modelo 377) mediante paseos cromosómico en ambas hebras en del fragmento amplificado.

5 Para la transferencia de puntos, la sonda utilizada fue el gen *nadA* completo, tal como se amplificó a partir de la cepa 2996 y se marcó con digoxigenina utilizando el kit de detección y marcaje de ADN DIG-High Prime de Roche. Se llevó a ebullición un alícuota de 10 µl de suspensión celular de cada cepa durante 10 minutos y se pasaron puntos sobre la membrana de nylon (Boehringer). Las membranas se sometieron a reticulación de ADN mediante exposición en 2' a luz UV y otros procedimientos estándar para la preparación y la detección de señales como indica el fabricante.

El gen *nadA* estaba ausente en *N. gonorrhoeae* y en las especies comensales *N. lactamica* y *N. cinerea*. No obstante, en *N. meningitidis*, el 47 % de los aislamientos fueron positivos para su presencia.

15 La PCR generó (Figura 13) un producto de 1.800 pb de cepas MC58 NadA<sup>+</sup> (calle 1), 90/18311 (calle 2) y 2996 (calle 3). Proporcionó un producto de 400 pb en la cepa Z2491 NadA<sup>-</sup> y NG3 /88 (calle 5). Algunas cepas (por ejemplo, 93/4286, C4678, 2022, ISS1113) dieron un producto de PCR de 2.500 pb (calle 4: L93/4286).

20 La presencia /ausencia de NadA en *N. meningitidis* se correlacionó con el linaje de la cepa. Las cepas aisladas de una enfermedad meningocócica invasiva se han clasificado mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) en un pequeño número de linajes hipervirulentos: tipos electroforéticos ET37, ET5, clúster A4, linaje III, subgrupos I, III y IV-1 [Achtman (1995) Global epidemiology of meningococcal disease. En la enfermedad meningocócica (Cartwright, ed). John Wiley and Sons, Chichester, Inglaterra. 159-175; Caugant (1998) APMIS 106:505-25]. Recientemente, se ha introducido una clasificación basada en la secuencia, tipificación multilocus de secuencias (MLST), que clasifica las cepas anteriores en los tipos de secuencia ST11, ST32, ST8, ST41, ST1, ST5, ST4, respectivamente [Maiden y col., (1998) PNAS USA 95:3140-3145]. Las cepas aisladas de portadores sanos entran en muchos tipos diferentes de ET y ST.

25 El gen *nadA* estaba presente en 51 de las 53 cepas (96 %) de los linajes hipervirulentos ET-5, ET-37 y el clúster A4, mientras que estaba ausente en todas las cepas de linaje III analizadas. Siete de las 25 cepas portadoras fueron positivas. La mayoría de las cepas del serogrupo C analizadas fueron positivas, incluso si no pertenecían a linajes hipervirulentos. Lo mismo puede decirse para las cepas del serogrupo B con serotipo 2a y 2b. Para el serogrupo A, una cepa que pertenece al subgrupo III fue positiva, mientras que las otras dos cepas pertenecientes al subgrupo IV-1 fueron negativas.

35 El linaje III se ha introducido recientemente en Europa y EE.UU. y la segregación geográfica en Nueva Zelanda durante muchos años podría haber mermado su capacidad de adquirir nuevos genes. Por ejemplo, pueden haberse producido mutaciones en las regiones cromosómicas circundantes, lo que evita que se produzcan acontecimientos de recombinación en el linaje III. Otra posible explicación es que las cepas ET-5, ET-37 y clúster A4 necesitan que *nadA* alcance la idoneidad del pico, mientras que los aislados de linaje III no pueden obtener ningún beneficio significativo de la inserción de *nadA*, de modo que experimenta una selección negativa.

Por tanto, NadA está sobrerrepresentado en tres linajes de *N. meningitidis* hipervirulentos. Parece que hay un gen extraño presente en una subpoblación de cepas hipervirulentas.

#### **Alelos de NadA**

40 Dado que los productos de la PCR eran de tamaño diferente (Figura 13) y la mayoría de las cepas NadA<sup>+</sup> pudieron agruparse en tres tamaños diferentes, los genes se secuenciaron para 36 cepas representativas de cada tamaño: 26 cepas positivas, 4 cepas con un producto de PCR largo y 6 cepas NadA<sup>-</sup>.

En las cepas negativas, se encontró una secuencia de 16 pb que era idéntica a la secuencia presente en el la secuencia del genoma de serogrupo A publicada.

45 El análisis de la secuencia de las cuatro cepas de productos PCR largos reveló una interrupción por una sola copia de IS1301, que interrumpía la proteína después de 162 aminoácidos con un codón de terminación. El sitio de inserción era idéntico en las cuatro cepas, pero la orientación de IS1301 difería, lo que era indicativo de acontecimientos independientes. El consenso objetivo para IS1301, 5'-AYTAG-3', se encontró en el gen de NadA en el nucleótido 472, generado por una mutación A→G y se acompañó de una duplicación de TA.

50 En las cepas *nadA*<sup>+</sup>, el tamaño del gen osciló de 1086 a 1215 pb, con la consiguiente variación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas de 362 a 405 aminoácidos. Fue posible agrupar 22 de los 26 genes de NadA en tres alelos bien definidos (Figuras 9 y 10; Tabla I). La secuencia del gen dentro de cada alelo es idéntica y la identidad global entre los alelos varía de 96 % a 99 %. Este nivel de conservación es sorprendente y sugiere presión selectiva débil y /o una adquisición muy reciente del gen *nadA*. Esta última posibilidad es coherente con el bajo contenido de G + C del genoma en esta región (véase anteriormente).

Alelo	Encontrado en las cepas	SEQ ID
1	MC58, BZ83, BZ169, NM066, NM119, CU385, ISS832, ISS1071, ISS1104	1,4
2	90/18311, NGP165, PMC8, M986, ISS838 y 961–5945	2,5
3	C11, 973–1720, ISS759, F6124, 2996, 8047, nmb	3,6

Las secuencias mostradas en la Figura 9A suponen que el aminoácido N-terminal es la primera Met en el marco de lectura abierto (SEQ ID 4 a 6), pero la segunda Met (resto 3 en las SEQ ID 4 a 6) tiene un motivo de Shine-Dalgarno mejor posicionado (Figura 9B). Por tanto, se prefieren las secuencias a partir del segundo codón de Met (SEQ ID 1 a 3).

El **alelo 1** codifica una proteína de 362 aminoácidos (SEQ ID 1) e incluye la cepa MC58 y todas las cepas ET-5 positivas secuenciadas. Las otras cinco cepas pertenecientes al alelo 1 fueron aislados muy recientes y no se habían tipificado en ET todavía, aunque la clasificación en serotipo y serosubtipo (B:15:P1,7 and B:4:P1,15) de estas cepas sugiere la afiliación de estas cepas al complejo ET-5.

El **alelo 2** codifica una proteína de 398 aminoácidos (SEQ ID 2) resultante de la adición de 2 aa después del resto 268 (numeración de acuerdo con la SEQ ID 1), la adición de 41 aa después del resto 271 y la delección de 7 aa después del resto 122, lo que da como resultado la delección de la primera repetición héptada del dominio de la cremallera de leucina. Los restos de leucina en una distancia fija de siete restos identifican habitualmente cremalleras de leucina. Con frecuencia se ha reemplazado una leucina en las repeticiones en su mayoría por Met, Val o Ile. En este caso, el alelo 2 podría utilizar la Ile aguas arriba o aguas abajo para formar el motivo de la cremallera de leucina.

El **alelo 3** codifica una proteína de 405 aminoácidos (SEQ ID 3) y, al igual que el alelo 2, contiene 43 aminoácidos adicionales en los restos 268 y 271, pero difiere del alelo 2 en que no tiene la delección de 7aa después del resto 122. Alelo 3 se encuentra en las cepas de serogrupo A, B y C.

Las cepas positivas 4/26 restantes (ISS1024, ISS759, 973 a 1720, 95330; marcadas con \* en la Tabla 1) contienen variantes menores de los alelos 1 a 3:

- La cepa ISS1024 del serogrupo C tiene una variante del alelo 2 con una única delección de repetición de héptada en los restos 229-235 (SEQ ID 7/8). Esta secuencia se clasificó inicialmente como un cuarto alelo, pero se ha vuelto a clasificar como una variante del alelo 2. Por tanto, el alelo 2 se encuentra en todas las cepas ET-37, una cepa de clúster A4 y tres cepas adicionales de serogrupo C no tipificadas como ET.
- Las cepas ISS759 and 973–1720 del serogrupo C contienen ambas una variante del alelo 3 con una única mutación de aminoácidos en el péptido líder (SEQ ID 9/10) que es el resultado de una única mutación de nucleótidos. Entre todas las cepas del alelo 3, solamente 973-1720 pertenece a una cepa hipervirulenta (clúster A4).
- La cepa 95330 del serogrupo B contiene un recombinante (quimera) de los alelos 1 y 2 (SEQ ID 11/12), siendo *nadA* una fusión entre la porción N-terminal del alelo 2 y el segmento C-terminal de alelo 1. El supuesto sitio de recombinación se encuentra aproximadamente entre los restos 141 y 265 de la proteína.

Todas las inserciones y delecciones se producen en la región de hélice superenrollada e implican 7 o 41 aminoácidos, que, en representación de 2 o 6 vueltas de la  $\alpha$ -hélice, permiten variaciones en la longitud de la región de la hélice superenrollada sin perturbar la estructura global. Además, la delección en ISS1024 da lugar a la pérdida de la primera repetición héptada del dominio de cremallera de leucina, pero no destruye el dominio porque los restos de leucina en una distancia fija de siete restos pueden ser sustituidos en su mayoría por Met, Val o Ile. En este caso, el alelo 2 podría utilizar la Ile aguas arriba o aguas abajo para formar el motivo de la cremallera de leucina (Figura 11).

Cuando el análisis de secuencia se extendió a las supuestas regiones promotora y de terminación (50 pb aguas arriba, 350 pb aguas abajo), se encontraron variaciones únicamente en la en la región 5'. Tres cepas italianas (ISS1071, ISS832 y ISS1104) diferían por una única mutación de base, mientras que en la cepa 961–5945 había una diferencia de 7 bases (indicado con \* en la Figura 10). También se encontraron variaciones en las regiones 5', en las que el tetranucleótido TAAA se repitió de 4 a 12 veces en diferentes cepas (Tabla 1). El número de repeticiones era variable también dentro de cada alelo (Tabla 1).

Se realizaron trabajos adicionales con cepas portadoras aisladas de individuos sanos mediante frotis orofaríngeo. Algunas cepas, aunque se describan como portadoras, pertenecen a grupos hipervirulentos, y *NadA* se encontró en todas estas cepas portadoras como se ha descrito anteriormente (es decir, alelo 1 en las cepas ET-5 y alelo 2 en las cepas ET-37).

NadA también se encontró en cinco cepas portadoras (NGE28, 65/96, 149/96, 16269, 16282) que no pertenecen a un clúster hipervirulento. Estas cinco cepas compartían una secuencia (SEQ ID de 13 y 14) que no se encontró en las cepas aisladas de pacientes. Este alelo se denomina "alelo C" (portador).

5 Una alineación del alelo C con los alelos 1 a 3 se muestra en la Figura 9C. La alteración de los segmentos de hélice superenrollada de la proteína es evidente.

10 A diferencia de los alelos 1 a 3, la proteína del alelo C no forma fácilmente un agregado de alto peso molecular cuando se expresa en *E coli*. Al igual que los alelos 1 a 3, sin embargo, el alelo C está expuesto en la superficie de *N. meningitidis*, porque es un objetivo de los anticuerpos bactericidas producidos contra sí mismo. Sin embargo, estos anticuerpos no son bactericidas contra las cepas portadoras de los alelos 1 a 3; de manera similar, los anticuerpos generados contra los alelos 1 a 3 no son bactericidas contra las cepas del alelo C.

#### **Oligómeros de NadA sobre la superficie celular**

En el documento WO01/64922 se indica que NadA forma estructuras oligoméricas. Para estudiar los oligómeros de NadA con más detalle, los lisados de células enteras de *N. meningitidis* se sondaron mediante transferencia Western.

15 Las colonias bacterianas [cepas MC58 (alelo 1), 90/18311 (alelo 2), 2996 (alelo 3), L93 /4286 (inserción IS1301) y NG3 /88 (*nadA*<sup>-</sup>)] se cultivaron hasta la fase estacionaria en caldo GC suplementado con 0,3 % de glucosa. Se tomaron muestras en diferentes momentos, se sedimentaron mediante centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en PBS y se descongelaron /congelado hasta la lisis bacteriana. Cantidades iguales de proteínas se sometieron a SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12,5 % y se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa.

20 Para preparar suero policlonal anti-NadA, el NadA recombinante se expresó y purificó. Las secuencias que codifican los tres alelos de *nadA* (alelo 1: aa 24–362; alelo 2: aa 24–343; alelo 3: aa 24–350), se amplificaron mediante PCR sobre el ADN cromosómico y se clonaron en el vector pET21b+ (Novagen). Los plásmidos se transformaron en *E coli* BL21 (DE3) para expresar las proteínas como fusiones de histidina en C-terminal. La expresión de proteínas se indujo a 30 °C mediante la adición de IPTG 1 mM a una DO<sub>600nm</sub> de 0,3 y el crecimiento de las bacterias durante un período adicional de 3 horas; la expresión se evaluó mediante SDS-PAGE. Las proteínas de fusión recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad en resina Sepharose 4B de flujo alto quelante conjugada a Ni<sup>2+</sup>. Se usaron 20 µg de proteína purificada para inmunizar ratones CD1 hembra de seis semanas de edad (de 4 a 6 por grupo). Las proteínas se administraron por vía intraperitoneal, con adyuvante completo de Freund (ACF) para la primera dosis y adyuvante incompleto de Freund (AIF) para la segunda (día 21) y la tercera (día 35) dosis de refuerzo. Se tomaron muestras de sangre el día 49 y se utilizaron para el análisis serológico.

25 Las transferencias mostraron una banda reactiva de alto peso molecular en las cepas MC58 (Figura 14, calle 1), 90/18311 (calle 2) y 2996 (calle 3). La banda estaba ausente en la cepa NG3 /88 (calle 5). La ebullición del tampón de muestra hasta 40 minutos no cambió el patrón. El tamaño diferente de las proteínas fue consistente con el tamaño de los alelos. Dado el tamaño esperado de 35 a 40 kDa de las proteínas monoméricas, el alto PM de la banda observada podría explicarse por la presencia de una forma oligomérica de NadA. Esta posibilidad está avalada por el hecho de que en una cepa que contiene la inserción IS1301, que codifica una proteína más corta de 162 aminoácidos y carece de la mayor parte de la región de hélice superenrollada, la banda reactiva de PM alto estaba ausente y sustituida por una banda de 14,5 kDa (Figura 14, calle 4), consistente con el peso molecular predicho de la proteína monomérica procesada.

30 Aunque la proteína oligomérica se encontró en todas las cepas que contenían un gen funcional, los niveles de expresión variaron de una cepa a otra (Tabla 1). Por otra parte, la cantidad de proteína NadA variaba dentro de la misma cepa durante el crecimiento.

35 Se siguió el crecimiento de cuatro cepas diferentes (MC58, 2996, C11, F6124), elegidas como representativas de diversos niveles de expresión de NadA, hasta la fase estacionaria. La Figura 15 muestra el crecimiento de dos de las cepas analizadas (15A: MC58, con baja expresión de NadA; 15B: 2996, con alta expresión de NadA), mostrando la curva una DO<sub>600</sub>. Las transferencias Western de las muestras tomadas en cada punto de la curva de crecimiento a DO<sub>600</sub> mostraron que la banda de NadA era apenas visible al comienzo del crecimiento y se hizo más intensa durante el crecimiento, hasta su máximo, en fase estacionaria. Todas las cepas analizadas mostraron el mismo comportamiento dependiente de la fase de crecimiento.

40 También se observó NadA de PM alto en transferencias Western de vesículas de membrana externa, de acuerdo con que la NadA está anclada a la membrana externa.

45 Del mismo modo, el análisis FACS en bacterias vivas durante el crecimiento en fase logarítmica mostró que NadA estaba disponible para la unión del anticuerpo en la superficie de las bacterias. La intensidad de FACS en una cepa con una cápsula polisacárida (cepa nmb) se redujo 1 log en comparación con una cepa mutante no encapsulada isogénica (M7), pero la proteína se expuso en la superficie y estaba disponible para la unión en ambas cepas (Figura 16).

5 NadA forma oligómeros expuestos en la superficie, que son estables al calor, SDS y a la reducción con  $\beta$ -mercaptoetanol. Dado que la forma madura carece de restos de cisteína, la formación de enlaces disulfuro no puede participar en este fenómeno; más bien esto es consistente con la estructura de hélice superenrollada predicha y la presencia de motivos de cremallera de leucina que pueden participar en las interacciones intermoleculares entre monómeros [Lupas (1996) Trends Biochem. Sci. 21:375–382; O'Shea y col., (1991) Science 254:539-544]. El tamaño de los oligómeros es de aproximadamente 170 kDa, lo que sugiere una estructura tetramérica.

Documento [WO01/64922]. Sin embargo, es probable una estructura de hélice superenrollada rígida tenga una migración anómala en SDS PAGE y, por lo tanto, la forma de 170kDa puede ser un trímero.

### **Immunogenicidad protectora**

10 El suero policlonal anti-NadA se analizó para determinar la actividad bactericida como se ha descrito anteriormente [Pizza y col., (2000); Peeters y col., (1999) Vaccine 17:2702–2712], con suero de conejo neonato combinado (CedarLane), utilizado como fuente de complemento. El título bactericida en suero se definió como la dilución de suero que da como resultado una disminución del 50 % en las unidades formadoras de colonias (UFC) por ml después de 60 minutos de incubación de las bacterias en la mezcla de reacción, en comparación con las UFC de control por ml a tiempo 0. Típicamente, las bacterias incubadas con el anticuerpo de control negativo en presencia de complemento mostraron un aumento del 150 al 200 % en las UFC /ml durante los 60 minutos de incubación.

Los resultados fueron los siguientes:

Cepa	Expresión de NadA	Alelo	Título bactericida
2996	+++	3	32768
C11	+++	3	16384
F6124	+	3	4096
MC58	+	1	8192
BZ232	–	–	<4
NGH38	–	–	<4

20 Como se muestra, el suero indujo la muerte mediada por el complemento de todas las cepas que tenían el gen *nadA* y estaba inactivo contra las cepas que no tenían el gen. Sin embargo, los títulos bactericidas variaron entre cepas. Los títulos fueron mayores frente a las cepas que expresaban mayores cantidades de proteína. Este resultado se confirmó cuando los títulos se determinaron en las fases temprana y tardía de crecimiento (Figura 15).

25 Para comprobar si las diferencias en la actividad bactericida se debían a secuencias de los alelos diferentes, se produjeron sueros inmunitarios, producidos contra los tres tipos de NadA, y se utilizaron en un ensayo bactericida cruzado. Los resultados obtenidos con los antisueros fueron similares a los que se han mostrado anteriormente, lo que sugiere que la actividad bactericida no está influida por la diversidad de los alelos sino más bien por el nivel de expresión del antígeno.

30 La capacidad de los sueros inmunitarios para proteger a los animales de la bacteriemia durante la infección también se analizó, utilizando el modelo de rata lactante. Los sueros utilizados se obtuvieron inmunizando cobayas con 50  $\mu$ g de rNadA purificado (alelo 3). La inmunización de ratas Wistar no consanguíneas (de 5 a 7 días de edad) se realizó por vía subcutánea junto con ACF para la primera dosis y AIF para las otras tres dosis (días 28, 56, 84). Se tomaron muestras de sangre el día 105 y se utilizaron para el ensayo de protección animal.

35 Se realizaron dos experimentos con dos cepas de MenB diferentes (8047 y 2996). Cada cepa se ha pasado en serie tres veces en crías de rata. En el Experimento 1, grupos de cuatro ratas fueron expuestos por vía intraperitoneal a 100  $\mu$ l de una mezcla de (a) bacterias de la cepa 8047 ( $7 \times 10^3$  UFC por rata) y (b) antisero de cobaya inactivado con calor o mAb de control anti-cápsula (SEAM 3 [Van Der Ley y col., (1992) Infect. Immun. 60:3156]). En experimento 2, se trató al grupo de seis ratas con los mAb de control o con diferentes diluciones de antisero de cobaya a tiempo 0. Dos horas más tarde, fueron expuestos a las bacterias 2996 ( $5,6 \times 10^3$  UFC por rata). En ambos experimentos, los cultivos de sangre se obtuvieron 18 horas después de la exposición mediante punción en el corazón con una jeringa y una aguja con aproximadamente 25 U de heparina sin conservante. El número de bacterias en los cultivos de sangre se obtuvo mediante cultivo en placas de 1, 10 y 100  $\mu$ l de sangre en agar chocolate durante la noche. Para el cálculo de la media geométrica de las UFC /ml, a los animales con cultivos estériles se les asignó un valor de 1 UFC /ml.

Los resultados fueron los siguientes:

Nº. Exp. <sup>t</sup>	Tratamiento	Cultivo de sangre a las 18 horas	
		Positivo /Total	UFC /ml (10 <sup>3</sup> )
1	mAb anti-capsular (2 µg/rata)	0/4	<0,001
	Antisuero anti-NadA (dilución 1:5)	0/4	<0,001
	PBS + 1 % de BSA	5/5	40,17
2	mAb anti-capsular (20 µg/rata)	1/6	0,003
	Antisuero anti-NadA (dilución 1:5)	1/6	0,002
	Antisuero anti-NadA (dilución 1:25)	3/6	0,035
	Suero de NadA preimmune	6/6	1,683

Por lo tanto, el antisuero anti-NadA es altamente protector en este ensayo.

En general, por lo tanto, NadA tiene varias características para ser un buen antígeno para vacuna: (i) es una molécula expuesta en la superficie, potencialmente implicada en la adhesión bacteriana; (ii) está presente en al menos el 50 % de las cepas asociadas a enfermedad y en casi el 100 % de los tres linajes hipervirulentos; (iii) produce anticuerpos protectores y bactericidas en animales de laboratorio; y (iv) cada alelo induce anticuerpos bactericidas cruzados.

#### ORF40

ORF40 muestra homología con Hsf y su variante alélica Hia, ambas adhesinas *Haemophilus influenzae*. El tamaño diferente entre Hia, Hsf y ORF40 se explica en parte por la presencia de tres copias de un dominio grande repetido en Hsf, que está presente en una sola copia en Hia y solo parcialmente en ORF40 (Figura 7). En MenB, ORF40 se encuentra en la membrana externa como una proteína de aproximadamente 200 kDa (véase el PM predicho de 59 kDa para la proteína madura).

#### App

App muestra homología (Figura 8) con la proteína de adhesión y de penetración Hap de *H. influenzae*, que es una adhesina con actividad de serina-proteasa que sufre escisión autoproteolítica y liberación extracelular [Hendrixson y col., (1997) Mol Microbiol 26:505–518]. La Hap asociada a la superficie sin escindir participa en la adhesión a las células epiteliales y promueve la agregación y la colonización bacteriana.

En *N. meningitidis*, App es exportada a la membrana externa, procesada y secretada. Tanto Hap como App pertenecen a la familia de autotransportadores que comprende proteínas de bacterias gramnegativas que se caracterizan por un mecanismo de secreción distinto. Este sistema se describió por primera vez para la IgA1 proteasa de *N. gonorrhoeae*, que se considera el prototipo de esta familia. Se ha implicado a las proteínas de la familia de autotransportadores en la virulencia de muchos patógenos gramnegativos [Henderson y Nataro (2001) Infect Immun 69:1231–1243]. Se sintetizan como proteínas precursoras grandes que comprenden al menos tres dominios funcionales: una secuencia líder N-terminal típica, un dominio interno (dominio pasajero) y un dominio C-terminal (dominio translocador o β-dominio). La secuencia líder participa en la exportación (dependiente de sec) de la proteína al periplasma. Posteriormente, el dominio translocador se inserta en la membrana externa que forma un poro en β-barril para permitir la exportación del dominio pasajero. Una vez en la superficie bacteriana, el dominio pasajero puede ser escindido y se libera al medioambiente. La escisión se puede producir mediante un acontecimiento autoproteolítico dirigido por la actividad de proteasa en el propio dominio pasajero. Los dominios de pasajero de los autotransportadores son muy divergentes, lo que refleja sus papeles notablemente dispares. Por el contrario, los β-dominios muestran un grado alto de conservación consistente con su función conservada.

App. posee los dominios prevalentes de las proteínas autotransportadoras, así como el motivo de la serina proteasa conservada (GDSGSP). Se ha demostrado que este motivo es responsable de la escisión de IgA humana por las proteasas IgA1 de *Neisseria* y para la escisión autoproteolítica de la proteína Hap de *H. influenzae*. Se ha demostrado que App es un antígeno conservado entre meningococos, que se expresa durante la infección y transporte, para estimular las células B y las células T, y para inducir una respuesta bactericida de anticuerpos [Hadi y col., (2001) Mol. Microbiol. 41:611–623; Van Ulsen y col., (2001) FEMS Immunol Med Microbiol 32:53–64].

En la cepa 2996 de serogrupo B, App tiene 1454 aminoácidos y un PM predicho de 159.965 Da. La figura 26 muestra las características estructurales predichas de la proteína. Se pueden ver tres dominios: el dominio 1 (aminoácidos 1-42) es el péptido señal; el dominio 2 es el dominio pasajero, que es la proteína funcionalmente

activa; el dominio 3 es el dominio translocador en C-terminal con estructura de barril  $\beta$ .

- En el N-terminal del dominio pasajero, His-115, Asp-158 and Ser-267 corresponden a la tríada catalítica de la serina proteasa His-98, Asp-140 y Ser-243 de Hap [Fink y col., (2001) J Biol Chem 276:39492-39500]. Los restos 285-302 son un supuesto sitio de unión a ATP /GTP (bucle P), que sugiere un mecanismo de acoplamiento de energía para la translocación de la membrana externa. Hacia el C-terminal del dominio pasajero, hay dos regiones ricas en Arg presentes. La primera (RRSRR) consiste en los restos 934-938 y la segunda (RRARR) comienza en el resto 1149. Estos motivos son una reminiscencia de las dianas conocidas para los sitios de escisión proteolítica de tipo tripsina, tales como el de la toxina de la difteria y los de aguas arriba de los sitios de autoescisión de Hap de *H. influenzae*, la IgA-proteasa de *N. gonorrhoeae* y FhaB de *B. pertussis* (Figura 26, recuadro 1). Aguas abajo de las regiones ricas en Arg son motivos<sup>954</sup>NTL<sup>956</sup> y<sup>1176</sup>NSG<sup>1178</sup>, que son idénticos o similares a los sitios de escisión en los autotransportadores Ssp (*Serratia marcescens*), Prn (*Bordetella bronchiseptica*), Brka (*Bordetella pertussis*) [Jose y col., (1995) Mol. Microbiol. 18:378-380] y Hap (*H. influenzae*) (Figura 26, recuadro 2). En conjunto, estos motivos de secuencia sugieren que los dos motivos<sup>954</sup>NTL<sup>956</sup> and<sup>1176</sup>NSG<sup>1178</sup> y el patrón RR(A,S,R)<sub>2</sub>RR podrían actuar como señales para la correcta localización de los sitios de procesamiento aguas abajo.
- Un análisis más detallado de la secuencia de App muestra una región rica en prolina, en la que el motivo dipeptídico PQ se repite cuatro veces comenzando en el resto 1156. Una búsqueda de homología con secuencias de proteínas conocidas revela alguna similitud con las proteínas de superficie de *S. pneumoniae* PspA y PspC y a una región rica en prolina de la proteína pertactina de membrana externa de *B. pertussis* p69, en la que el motivo (PQP)<sub>5</sub> se encuentra en un bucle que contiene el principal epítipo inmunoprotector.
- Finalmente, los últimos tres aminoácidos de App (YRW) son idénticos a los de Hap, en los que se han descritos como cruciales para la localización en la membrana externa y la estabilidad proteica [Hendrixson y col., 1997].

#### **Expresión en *E. coli* sin parejas de fusión**

Se clonaron los genes de longitud completa ORF40, App y NadA en el vector pET21b+ y los plásmidos se transformaron en *E. coli* BL21(DE3) con el fin de expresar los genes bajo el control del promotor T7. La expresión se consiguió mediante la activación del promotor con IPTG o en condiciones no inducidas. La localización y la exposición en la superficie de las proteínas se analizaron mediante experimentos de fraccionamiento celular (SDS-PAGE y transferencia Western), análisis FACS e inmunotransferencia de células enteras. Como se muestra en las figuras 1 a 3, las tres proteínas se translocan a la superficie de *E. coli*:

- ORF40 se expresa como forma monomérica y, posiblemente, también las formas multímeros (Figura 1).
  - La App se exporta a la membrana externa de *E. coli* como un precursor de aproximadamente 160 kDa, que se procesa y se secreta en el sobrenadante del cultivo (Figura 2).
  - Se encuentra que NadA está presente en la fracción de membrana externa como una única banda de alto peso molecular de aproximadamente 180 kDa. Esto probablemente corresponde a una forma oligomérica de la proteína. Dicha banda está ausente en *E. coli* que expresa NadA intracelular (Figura 3).
- Se estudió la expresión de App con más detalle.

El ADN genómico de la cepa 2996 de *N. meningitidis* se preparó como se ha descrito anteriormente [Tinsley y Nassif (1996) PNAS USA 93:11109-11114]. El ADN desprovisto de la secuencia que codifica el péptido señal (aminoácidos 1 a 42) y del codón de TERMINACIÓN se amplificó utilizando los cebadores para la PCR de las SEQ ID 18 y 19, seguido de la digestión con *NheI* y *XhoI* y la inserción en los sitios *NheI/XhoI* del vector de expresión pET-21b, para dar "pET-App-His" (Figura 27). Este plásmido se introdujo en *E. coli* BL21 (DE3) y se usó para la expresión de una proteína de fusión marcada con His en C-terminal, que se purificó y se utilizó para generar anticuerpos. El gen *app* de longitud completa se amplificó y se clonó de una manera similar, utilizando cebadores para PCR de las SEQ ID 20 y 21, para dar el plásmido "pET-App".

Los plásmidos se introdujeron en *E. coli* BL21 (DE3) y la expresión se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM. La proteína expresada se detectó mediante transferencia Western (Figura 28, calle 1). Para comprobar que la proteína se exportó a la superficie de *E. coli*, se utilizaron FACS (Figura 29) y microscopía de inmunofluorescencia (Figura 30). El análisis FACS mostró expresión en la superficie positiva en los transformantes pET-App (gen de longitud completa), pero ninguna expresión en la superficie con App-His (sin péptido señal) o con el vector vacío. Los resultados de inmunofluorescencia coincidían con los del análisis FACS. Por lo tanto, la expresión del gen *app* de longitud completa dio lugar a la exportación de App a la superficie de *E. coli*, pero la delección de los primeros 42 aminoácidos abolió la localización en la superficie.

El análisis de transferencia Western de las proteínas de membrana externa de los transformantes pET-App reveló una banda reactiva específica de ~ 160 kDa (Figura 28, calle 1), correspondiente al peso molecular predicho de la proteína de longitud completa. Una banda correspondiente faltaba en la fracción de la membrana externa de los controles no transformados (calle 3). El análisis de transferencia Western de los sobrenadantes del cultivo reveló una proteína secretada de ~ 100 kDa con pET-App (calle 2) que estaba ausente con los controles no transformados

(calle 4). A veces también se detectó una banda muy débil en ~140 kDa en los transformantes pET-App.

Por lo tanto, el gen *app* de longitud completa cuando se introdujo en *E coli* induce la expresión de una proteína App que se exporta a la membrana externa, se escinde y se libera en el sobrenadante del cultivo.

#### **La expresión nativa puede influir en la calidad de la respuesta inmunitaria**

- 5 Para evaluar el papel de la conformación de la proteína en la inducción de una respuesta inmunitaria, las vesículas de membrana externa de *E coli* que expresan ORF40, App o NadA se aislaron y se utilizaron para inmunizar a los ratones. Los sueros se analizaron para determinar la actividad bactericida y los resultados en comparación con los obtenidos con las proteínas de fusión. La respuesta bactericida (cepa 2996) se mejoró 5-10 veces cuando las proteínas se producen en su forma "nativa" en las VME.

Antígeno	Títulos bactericidas*	
	Proteína de fusión	VME de <i>E. coli</i>
ORF40	256	2048
App	64	1024
NadA	32768	>65536

\* Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución del suero, dando ~ 50 % de muerte de bacterias

10

#### **Escisión autoproteolítica de App**

Los transformantes pET-App de *E. coli* secretan un producto de 100 kDa en el sobrenadante del cultivo y muestran un producto de superficie de 160 kDa. Para analizar si el producto App secretado deriva de un proceso autoproteolítico, uno de los supuestos restos catalíticos (Ser-267) se reemplazó con Ala.

- 15 El mutante pET-AppS267A se obtuvo mediante mutagénesis dirigida al sitio usando el kit QuikChange (Stratagene) y los cebadores de las SEQ ID 22 y 23.

El análisis SDS-PAGE de las proteínas totales de los transformantes pET-AppS267A (figura 31, calle 2) mostró una proteína similar en tamaño a los transformantes pET-App (calle 1). Se demostró que la proteína estaba expuesta en la superficie mediante análisis FACS (Figura 29). El análisis Western de los sobrenadantes del cultivo mostró App en los transformantes pET-App (Figura 32, calle 1), pero no en los transformantes pET-AppS267A (calle 2).

20

Por tanto, la mutación de Ser-267 a Ala suprime el procesamiento y la secreción del precursor de App, que permanece asociado a las células. Estos datos sugieren que App tiene una actividad serina proteasa que es responsable del procesamiento autoproteolítico y la liberación en el sobrenadante del dominio de App secretado.

- 25 La escisión en <sup>934</sup>NTL<sup>956</sup> dejaría un fragmento con el peso molecular predicho de 104.190 Da. La escisión en <sup>1176</sup>NSG<sup>1178</sup> daría un fragmento de 128.798 Da. Estos dos fragmentos predichos pueden coincidir con las dos bandas de ~140 y ~ 100 kDa observadas en los sobrenadantes del cultivo. La escisión puede producirse primero para dar el fragmento de ~140 kDa y, en segundo lugar para dar el fragmento de 100 kDa. Por tanto, el dominio P de App comenzaría en el resto 1177.

#### **NadA, ORF40 and App funcionan como adhesinas**

- 30 En el ejemplo 22 de la solicitud de patente internacional WO01/64922 se divulga que la expresión de NadA en *E coli* hace que la bacteria transformada se adhiera a las células epiteliales humanas. El fenotipo de adhesión se ha estudiado además para NadA y también para App y ORF40.

35 Bacterias *E. coli* BL21(DE3) (10<sup>8</sup> UFC), cultivadas en condiciones no inducidas o inducidas, se inocularon en monocapas epiteliales humanas de Chang (10<sup>5</sup> células) y se incubaron a 37 °C durante 1 o 2 horas. A continuación se incubaron las células con anticuerpos secundarios de conejo anti-*E coli* y conjugados a PE. La adhesión se detectó mediante FACS como la intensidad de fluorescencia específica asociada a las células de Chang. Los controles positivos eran *E coli* DH5 que expresan *hsf* (DH5/pDC601)); los controles negativos fueron BL21(DE3)/pET21b y DH5a/pT7-7. Los resultados de la Figura 4 muestran que la capacidad de las cepas de *E coli* recombinante para adherirse a las células epiteliales cultivadas se asocia con la expresión de estas tres proteínas.

- 40 Para confirmar que estas tres proteínas son capaces de promover la interacción con las células huésped, las propias proteínas recombinantes se investigaron para determinar la unión a las células epiteliales. Se incubaron 10<sup>5</sup> células epiteliales humanas de Chang (derivado de Wong-Kilbourne, clon 1-5c-4, conjuntiva humana) a 4 °C durante 30 minutos con medio solo o con diferentes concentraciones de ORF40 (150 µg/ml), App (150 µg/ml) o NadA (300

µg/ml) o con GNA2132 (300 µg/ml) como control negativo [véase Pizza y col., (2000)]. La unión se detectó mediante FACS utilizando antisueros policlonales contra las proteínas recombinantes individuales y un anticuerpo secundario conjugado con PE. Los cambios de la señal de FACS (Figura 5) muestran que las tres proteínas son capaces de unirse a las células epiteliales humanas, mientras que GNA2132 purificado (control negativo) no lo hace.

5 La Figura 6A muestra que la unión aumenta de una manera dependiente de la dosis. La unión de NadA alcanza una meseta a aproximadamente 200 µg /ml. GNA2132 no puede unirse incluso a 400 µg/ml (Figura 6B). Los datos en la figura 6 son los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) representados frente a la concentración de la proteína (µg/ml).

10 Usando FACS, la unión de NadA a las células también se observó con células Hep-2 y MOLT-4, pero no con células HeLa, A549, HEC-1B, Hep-G2, CHO o HUVEC. La adhesión a las células Chang podría anularse mediante el tratamiento de las células con pronasa, lo que indica que el receptor humano para NadA es una proteína.

15 También se observó adhesión de la proteína NadA purificada a las células de la conjuntiva de Chang mediante microscopia de inmunofluorescencia. La proteína (que carece de su dominio de anclaje C-terminal) se incubó con células de Chang a 37 °C en medio de cultivo completo durante 3 horas a varias concentraciones. Después, las células se lavaron, se fijaron y se analizaron por microscopia confocal láser después de la tinción con anticuerpos policlonales anti-NadA de ratón y anticuerpos secundarios IgG anti-ratón acoplados a rojo Texas. No se observó unión a 0 nm (figura 17A), pero la unión fue evidente a 170 nm (17B) y 280 nm (17C), con la agrupación evidente a concentraciones más altas. Por el contrario, no se observó unión de NadA con células HeLa, incluso en la proteína 280 nm (17D).

20 La unión fue mucho más evidente a 37 °C (figura 18A) que a 4 °C (figura 18B). Las estructuras en forma de puntos observadas a 4 °C, en comparación con los clústeres a 37 °C, sugieren que las interacciones laterales entre monómeros de NadA son dependientes de la temperatura (influido por la fluidez de la membrana).

25 Para distinguir la proteína de superficie y la endocitada, se añadió detergente saponina durante el procedimiento de tinción. Los clústeres intracelulares que tienen el tamaño de los endosomas fueron más evidentes (flecha) cuando se utilizó saponina, pero una alta proporción de proteína se mantuvo en la superficie celular (figura 19).

La inmunofluorescencia reveló también que NadA se une a monocitos (Figura 20A). NadA solo (sin anticuerpo de tinción; 20B) y NadA teñida con suero preinmune (20C) no eran visibles. A gran aumento, se observaron signos de absorción en vesículas (ya sea endosomas o fagosomas).

30 La figura 21 muestra que los macrófagos murinos (raw 264,7) se unen a NadA y lo endocitan (125 nM, 3 horas, 37 °C; células cultivadas en DMEM).

El calentamiento de NadA a 95 °C durante 15 minutos antes de la incubación eliminó su capacidad de unirse a los monocitos, medido mediante la secreción de IL-α por las células (figura 22). Por tanto, la actividad estimuladora de las preparaciones de NadA es termolábil. La actividad estimulante también se bloqueó mediante el uso de anti-CD14 (figura 23) o mediante la eliminación de NadA de las preparaciones usando anti-NadA inmovilizado en perlas.

35 También se usó microscopia de inmunofluorescencia para detectar la unión de *E coli* que expresa NadA. *E. coli* transformada se unió fuertemente (figura 24A), mientras que las bacterias no transformadas no (24B). La liberación de IL-α por los monocitos era más de 1,5 veces más alto usando *E coli* transformada que las bacterias no transformadas con una relación de bacterias /monocitos de 40:1.

40 Las *E coli* transformada se unieron a cubreobjetos de vidrio, se fijaron y se sometieron a tinción doble con anti-NadA (figura 25A) y anticuerpos anti-*E coli* (25B). Cuando se utilizaron ambas, los parches de anti-NadA fueron visibles, lo que sugiere que NadA tiende a formar agregados en la superficie bacteriana, que dificultan la interacción de los anticuerpos con otros antígenos de superficie.

45 En cuanto a APP, las cepas de *E coli* recombinante se incubaron con monocapas de células epiteliales de la conjuntiva de Chang (derivado de Wong-Kilbourne, clon 1-5 C-4 [conjuntiva humana], ATCC CCL 20.2), y se analizó la adhesión mediante FACS. Las células obtenidas a partir de monocapas confluentes se sembraron a  $10^5$  células por pocillo en placas de cultivo tisular de 12 pocillos y se incubaron durante 24 horas. Los cultivos de bacterias después de la inducción con IPTG se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en DMEM + 1 % de FBS a una concentración de  $5 \times 10^8$  bacterias por ml. Se añadieron alícuotas de 1 ml de cada cepa a cultivos en monocapa de células de Chang y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Las bacterias no adherentes se eliminaron lavando tres veces con PBS, y se añadieron 300 µl de solución de disociación celular (Sigma) a cada pocillo de 50 microtitulación. La incubación continuó a 37 °C durante 10 minutos. Se recogieron las células y después se incubaron durante 1 hora a 4 °C con antisero anti-*E. coli* policlonal de conejo (DAKO). Las células se lavaron dos veces en PBS + 5 % de FBS y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con IgG anti-conejo conjugada con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después, las células se lavaron en PBS + 5 % de FBS y se resuspendieron en 100 µl de PBS. Se midió la fluorescencia con citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). 55 Para cada uno del perfil de fluorescencia, se analizaron 10.000 células.



Los resultados presentados en la Figura 33 muestran que los transformantes de pET-App fueron capaces de adherirse a las células de Chang, dando un cambio de fluorescencia de 90,3 %. Los transformantes S267A también pudieron adherirse (91,0 %). *E coli* no transformadas fueron capaces de adherirse a las células de Chang (gráfico inferior del FACS).

5 En cuanto a NadA, los resultados del análisis FACS eran coherentes con los datos de microscopia de inmunofluorescencia. Como se muestra en las figuras 34A y 34B, los transformantes pET-App incubados con monocapas demostraron niveles altos de adhesión a células epiteliales y agregación bacterias-bacterias visible. Para la mutante S267A, la adhesión y agregación bacteriana aumentaron (34C y 34D). Los controles no transformados no mostraron adhesión (34G). La delección de los primeros 42 aminoácidos también suprimió la adhesión.

10 En contraste con las células epiteliales de Chang, no se observó ninguna adhesión cuando se analizaron las células endoteliales HUVEC con transformantes pET-App. Para producir sepsis y meningitis, *N. meningitidis* tiene que interactuar con las células endoteliales humanas. Por tanto, App puede estar implicada en la primera etapa de la colonización a nivel de la mucosa del epitelio respiratorio humano, en lugar de en la colonización endotelial patológica.

### Localización y especificidad de la actividad de unión a App

Para identificar la región de unión de App, se utilizó una proteína quimérica denominada App $\beta$ . Esta proteína consiste en el dominio C-terminal de App (aminoácidos 1077 a 1454) fusionado al péptido líder de la proteasa IgA1 de *N. gonorrhoeae*. La secuencia líder gonocócica se eligió porque se ha caracterizado bien y es funcional en *E coli*. El plásmido pET-App $\beta$  contiene un fragmento de ADN de 1,1 kpb amplificado por PCR utilizando las SEQ ID 26 y 27.

La construcción pET-App $\beta$  se introdujo en *E coli* BL21 (DE3). Los estudios de localización con FACS confirmaron que App $\beta$  estaba localizada en la superficie de *E. coli*. El ensayo de adhesión *in vitro* usando células epiteliales de Chang mostró adhesión mediante inmunofluorescencia (Figura 34E y 34F). El análisis FACS mostró que los transformantes pET-App $\beta$  todavía eran capaces de adherirse a las células epiteliales, pero a niveles más bajos (74,2 % de desplazamiento) que los transformantes pET-App.

Estos resultados indican que el dominio de unión de App se encuentra en su región C-terminal, en el fragmento de 100 unidades entre los restos 1077 y 1176.

También se estudiaron las proteínas recombinantes purificadas. App- $\alpha$ -His consiste en la porción N-terminal de App (aminoácidos 43-1084) fusionada a una cola de poli-His. El plásmido pET-App $\alpha$ -His contiene un fragmento de 3,1 kpb de *NheI/XhoI* amplificado mediante PCR con las SEQ ID 24 y 25. La actividad de unión de App- $\alpha$ -Su recombinante purificado se comparó con la de App-His mediante ensayos de unión por FACS. Las células de Chang se incubaron con concentraciones crecientes de las proteínas App recombinantes o la lipoproteína nmb2132-His (control negativo). La unión de App-His (◆) aumentó de una manera dependiente de la dosis y alcanzó una meseta a una concentración de ~ 50 $\mu$ g /ml, mientras que la unión de App $\alpha$ -his App $\alpha$ -his (■) era muy baja (Figura 35). El control nmb2132-His (A) pudo unirse a las células de Chang.

Para explorar la naturaleza bioquímica de la molécula implicada en la interacción App, las células de Chang se trataron con pronasa o fosfolipasa A2 antes de los experimentos de unión. 10<sup>5</sup> células por pocillo se colocaron en microplacas y se incubaron en DMEM libre de FCS a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos con (a) pronasa a 250, 500, o 1.000  $\mu$ g/ml o (b) fosfolipasa A2 a 50, 200, o 800  $\mu$ g/ml. Después de la incubación enzimática, se añadió un volumen igual de medio completo a cada pocillo para detener la reacción. Posteriormente, las células se mezclaron con 100  $\mu$ g/ml de App-His o medio solo y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Como se muestra en la Figura 36, el tratamiento con pronasa (columnas de la izquierda) redujo marcadamente la unión de la proteína App-His a las células de Chang, mientras que el tratamiento con fosfolipasa A2 (columnas de la derecha) no redujo la unión. Por tanto, el receptor para App en células de Chang es proteináceo.

45 La adhesión a diferentes líneas celulares también se analizó (Figura 37). Después de la incubación de las células cultivadas con tres concentraciones diferentes de App-His (100, 25 y 6,25  $\mu$ g/ml) se observó una unión a las células de Chang y a las células HepG2 de nivel alto, un nivel moderado de unión a las células A-549 y una unión mínima a las células HeLa. No se observó unión a las líneas de células epiteliales Hec-1-B, Hep-2, 16HBE14o o a las células endoteliales HUVEC.

### 50 Defectivos en App

Después de los trabajos con *E coli* que sugerían un papel de adhesina para App, se construyó una cepa mutante isogénica de *N. meningitidis*. La cepa de partida fue MC58. Su gen app se truncó y se reemplazó con un casete de antibiótico mediante la transformación de la cepa parental con el plásmido pBSUDAppERM, que contiene un gen app truncado y el gen ermC (resistencia a eritromicina) para el intercambio alélico. En pocas palabras, 600 pb de la región flanqueante aguas arriba, que incluye el codón de iniciación y 700 pb aguas debajo de la región flanqueante aguas abajo que incluye el codón de terminación se amplificaron a partir MC58 utilizando los cebadores SEQ ID 28 a 31. Los fragmentos se clonaron en pBluescript y se transformaron en *E coli* DH5 usando técnicas estándar. Una vez

5 que toda la subclonación se hubo completado, la cepa MC58 de *N. meningitidis* competente naturalmente se transformó mediante la selección de unas colonias cultivadas durante la noche en placas de agar GC y se mezclaron con 20 µl de Tris HCl 10 mM a pH 8,5 que contiene 1 µg de ADN plasmídico. La mezcla se pasó a una placa de agar GC, se incubó durante 6 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, a continuación se diluyó en PBS y se extendió en placas de agar GC que contenían 5 µg /ml de eritromicina. El gen app de delección en el genoma de MC58 se confirmó mediante PCR. La falta de expresión de App se confirmó mediante análisis de transferencia Western.

10 La adhesión de MC58 de tipo silvestre y la cepa mutante MC58Δapp isogénica se evaluó en las células de Chang. Se produjo una reducción ~ 10 veces (que varía de 3 a 27 veces en diferentes experimentos) de la asociación de los mutantes defectivos en comparación con la cepa de tipo silvestre (Figura 38). No se observaron diferencias entre el mutante app<sup>-</sup> y la cepa parental con las líneas celulares Hep2 y 16HBE14o y con las células endoteliales HUVEC, confirmando que App no participa en la adhesión a estas células.

No se han notificado anteriormente adhesinas sin pilus que contribuyen a la adhesión de *N. meningitidis* en un fondo encapsulado.

15 Se estudió la expresión de App con *N. meningitidis* MC58. Las colonias de las placas cultivadas durante la noche se diluyeron en caldo GC y se incubaron a 37° C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se tomaron muestras cuando DO<sub>620nm</sub> = 0,5 (fase log media) y 0,8 (fase estacionaria) y se analizaron mediante transferencia Western. Dos bandas con pesos moleculares aparentes ~ 160 y ~140 kDa se detectaron en lisados de células enteras de bacterias en fase log (Figura 39, calle 1), mientras que las bacterias en fase estacionaria mostraron solamente una banda débil en ~140 kDa (calle 3). Como era de esperar, no se observó App en el mutante ΔApp (calles 2 y 4).

20 En marcado contraste, las muestras de sobrenadante de MC58 tipo silvestre mostraron una banda a ~140 kDa y su importe fue superior en fase estacionaria que en la fase log (Figura 40, calles 3 y 1). La muestra de la fase estacionaria también mostró una banda reactiva a ~ 100 kDa.

Debe entenderse que la invención se ha descrito anteriormente únicamente a modo de ejemplo y que se pueden realizar modificaciones permaneciendo dentro del alcance de las reivindicaciones.

25 **TABLA I – Características de 26 cepas de *N. meningitidis* y su alelo del gen *nadA***

Cepa	Tipo de serogrupo: subtipo	Grupo clonal	Alelo de <i>nadA</i>	Repeticiones (TAAA)	Expresión de <i>NadA</i>
64/69	NG:15:P1,7,16	ET-5	1	4	+
BZ83	B:15	ET-5	1	5	+++
CU385	B:4:P1,15	ET-5	1	6	++
MC58	B:15:P1,7,16b	ET-5	1	9	+
BZ169	B:15:P1,16	ET-5	1	12	++
95330*	B:4:P1,15	ET-5	1	9	nr
ISS1104	B:15:P1,7,16	nr	1	4	+
ISS1071	B:15:P1,7,16	nr	1	5	+++
ISS832	B:15:P1,7	nr	1	5	++
NM119	B.4.P1,15	nr	1	6	nr
NM066	B:15:P1,7,16	nr	1	12	nr
90/18311	C:NT:P1,5	ET-37	2	9	++
NGP165	B:NT:P1,2	ET-37	2	9	++
FAM18	C:2a:P1,5,2	ET-37	2	9	nr
M986	B:2a:P1,5,2	ET-37	2	12	++

(continuación)

Cepa	Tipo de serogrupo: subtipo	Grupo clonal	Alelo de nadA	Repeticiones (TAAA)	Expresión de NadA
ISS1024*	C:2b:P1,5	nr	2	9	++
ISS838	C:2a:P1,5,2	nr	2	6	++
PMC8	C:	nr	2	10	++++
961–5945	B:2b:P1,21,16	A4	2	12	+++
ISS759*	C:2b:P1,2	nr	3	8	++++
F6124	A	Subgrupo III	3	9	+
nmb	B:2b:P1,5,2	nr	3	12	++
8047	B:2b:P1,2	nr	3	12	+++
2996	B:2b:P1,5–1,2	nr	3	12	+++
C11	C:NT:P1,1	nr	3	12	+++
973–1720*	C:2b:P1,2	A4	3	12	+++
* Indica que la cepa transporta una variante menor del alelo relevante nr = no realizado					

**TABLA II – Características de las cepas de *N. meningitidis* analizadas para determinar la expresión de NadA**

ST	ET	Cepa	Año	Tipo de serogrupo: subtipo	País	Enfermedad	Gen <i>NadA</i>
74	ET5	MC58	1985	B:15:P1,7,16b	Reino Unido	caso	+
32	ET5	H44/76	1976	B:15:P1,7,16	Noruega	caso	+
32	ET5	BZ169	1985	D:15:P1,16	Países Bajos	caso	+
32	ET5	30/00	2000	B:15:P1,7,16	Noruega	caso	+
33	ET5	N44/89	1989	B:4,7:P1,19,15	Brasil	caso	+
34	ET5	BZ83	1984	B:15	Países Bajos	caso	+
–	ET5	72/00	2000	B:15:P1,7,13	Noruega	caso	+
–	ET5	39/99	1999	C:15:P1,7,16	Noruega	caso	+
–	ET5	M4102	1996	B:ND	EE.UU.	caso	+
–	ET5	95330	1995	B:4:P1,15	Canadá	caso	+
–	ET5	2201731	1993	NG:4:P1,15	Islandia	vehículo	+
–	ET5	64/96	1996	NG:15:P1,7,16	Noruega	vehículo	+
–	ET5	CU385	1980	B:4:P1,15	Cuba	caso	+
–	ET5	8680	1981	B	Chile	caso	+
–	ET5	204/92	1992	B	Cuba	caso	+
–	ET5	EG329	1985	B	Alemania	caso	+
–	ET5	NG080	1981	B	Noruega	caso	+
–	ET5	NG144/82	z2	B	Noruega	caso	+
–	ET5	NG PB24	1985	B	Noruega	caso	+
–	ET5	196/87	1987	C	Noruega	caso	+
–	ET5	Mk521/99	1999	B	Costa de Marfil	caso	+
–	ET5	GR 4/00	2000		Grecia	caso	+
11	ET37	FAM18	1983	C:2a:P1,5,2	EE.UU.	caso	+
11	ET37	L93/4286	1993	C	Reino Unido	caso	+
–	ET37	NGP165	1974	B:NT:P1,2	Noruega		+
–	ET37	M986	1963	B:2a:P1,5,2	EE.UU.	caso	+
–	ET37	C4678	1998	C:2a:P1,5,2	Alemania	caso	+
–	ET37	95N477	1995	B:2a:P1,2	Australia	caso	–

ES 2 615 362 T3

(continuación)

ST	ET	Cepa	Año	Tipo de serogrupo: subtipo	País	Enfermedad	Gen <i>NadA</i>
-	ET37	BRAZ10	1976	C	Brasil	caso	+
-	ET37	F1576	1984	C	Ghana	caso	+
-	ET37	M597	1988	C	Israel	caso	+
-	ET37	500	1984	C	Italia	caso	+
-	ET37	D1	1989	C	Mali	caso	+
-	ET37	NG P20	1969	B	Noruega	caso	+
-	ET37	MA-5756	1985	C	Saín	caso	+
-	ET37	38V1	1964	B	EE.UU.	vehículo	+
-	ET37	N1/99	1999	C:2a	Noruega	caso	+
-	ET37	N28/00	2000	W-135:2a	Noruega	caso	+
66	A4	973-1720	1997	C:2b:P1,2	Australia	caso	+
153	A4	961-5945	1996	B:2b:P1,21,16	Australia	caso	+
-	A4	5/99	1999	B:2b:P1,5,2	Noruega	caso	+
-	A4	312294	1995	C:2b:P1,5,2	Reino Unido	caso	+
-	A4	96217	1996	B:2b:P1,5,10	Canadá	caso	+
-	A4	G2136	1986	B	Reino Unido	caso	+
-	A4	312 901	1996	C	Reino Unido	caso	+
-	A4	AK22	1992	B	Grecia	caso	+
-	A4	BZ10	1967	B	Holanda	caso	+
-	A4	BZ163	1979	B	Holanda	caso	+
-	A4	B6116/77	1977	B	Islandia	caso	+
-	A4	94/155	1994	C	Nueva Zelanda	caso	+
-	A4	SB25	1990	C	Sudáfrica	caso	+
-	A4	N53/00	2000	C:2b:P1,5,2	Noruega	caso	+
-	A4	N62/00	2000	C:2b:P1,5,2	Noruega	caso	+
41	Lin.III	BZ198	1986	B:NT	Países Bajos	caso	-
42	Lin.III	M198/254	1998	B:4:P1,4	Nueva Zelanda	caso	-
158	Lin.III	972-0319	1997	B:NT:P1,4	Australia	caso	-
159	Lin.III	980-2543	1998	B:NT:P1,4	Australia	caso	-
1127	Lin.III	67/00	2000	B:4,7	Noruega	caso	-
-	Lin.III	93/114	1993	C:4:P1,4	Bélgica	caso	-
-	Lin.III	M198/172	1998	B:4:P1,4	Nueva Zelanda	caso	-
-	Lin.III	347/97	1997	B:4:P1,4	Nueva Zelanda	caso	-
-	Lin.III	386/98	1998	B:4:P1,4	Nueva Zelanda	caso	-
-	Lin.III	389/98	1998	B:4:P1,4	Nueva Zelanda	caso	-
-	Lin.III	392/98	1998	B:4:P1,4	Nueva Zelanda	caso	-
-	Lin.III	394/98	1998	B:4:P1,4	Nueva Zelanda	caso	-
-	Lin.III	400	1991	B	Austria	caso	-
-	Lin.III	M40/94	1994	B	Chile	caso	-
-	Lin.III	AK50	1992	B	Grecia	caso	-
-	Lin.III	M-101/93	1993	B	Islandia	caso	-
-	Lin.III	931905	1993	B	Países Bajos	caso	-
-	Lin.III	91/40	1991	B	Nueva Zelanda	caso	-
-	Lin.III	50/94	1994	B	Noruega	caso	-
-	Lin.III	N45/96	1996	B	Noruega	caso	-
-	Lin.III	88/03415	1988	B	Escocia	caso	-
1	sl	BZ133	1977	B:NT	Países Bajos	caso	-
5	sIII	F6124	1988	A	Chad	cause	+
4	sIV-I	205900	1990	A 4,21:P1,7:1	Mali	caso	-
4	sIV-1	Z2491	1983	A	Gambia	caso	-
12	otro	NG3/88	1988	B:8(2):P1,1	Noruega	cause	-
13	otro	NG6/88	1988	B:NT:P1,1	Noruega	caso	-
14	otro	NGF26	1988	B:NT:P1,16	Noruega	vehículo	-
15	otro	NGE31	1988	B:NT	Noruega	vehículo	-
18	otro	528	1989	B:nd	Rusia	caso	-
20	otro	1000	1988	B: NT:P1,5	Rusia	caso	-
22	otro	A22	1986	W-135	Noruega	vehículo	-
26	otro	NGE28	1988	B:4	Noruega	vehículo	+
29	otro	860800	1986	Y	Países Bajos	caso	-
31	otro	E32	1988	Z	Noruega	vehículo	-

ES 2 615 362 T3

(continuación)

ST	ET	Cepa	Año	Tipo de serogrupo: subtipo	País	Enfermedad	Gen <i>NadA</i>
35	otro	SWZ107	1986	B:4:P1,2	Suiza	caso	-
36	otro	MGH38	1988	B:NT:P1,3	Noruega	vehículo	-
38	otro	BZ232	1964	B:NT:P1,2	Países Bajos	caso	-
39	otro	E26	1988	X	Noruega	vehículo	-
43	otro	NGH15	1988	B:8:P1,15	Noruega	vehículo	-
47	otro	NGH36	1988	B:8:P1,2	Noruega	vehículo	-
48	otro	BZ147	1963	B:NT	Países Bajos	caso	-
49	otro	297-0	1987	B:4:P1,15	Chile	vehículo	-
540	otro	2996	1975	B:2b:P1,5-1,2	Reino Unido	caso	+
1034	otro	96/1101	1996	C:14:P.1,1,7	Bélgica	caso	-
-	otro	15	1990	B:14,19:P1,9,15	Eslovenia	caso	-
-	otro	M1090	1996	B:4	Israel	caso	-
-	otro	M1096	1996	C:NT:P1,5	Israel	caso	-
-	otro	B3937	1995	B:22:P1,16	Alemania	caso	+
-	otro	31	1993	B:4	Finlandia	caso	-
-	otro	95074	1995	B:NT:P1,13	Canadá	caso	+
-	otro	660/94	1994	B:4:P1,6	Algeria	caso	-
-	otro	30/93	1993	B:14:P1,14	Argentina	caso	-
-	otro	24370	1996	B:ND	Sudáfrica	caso	-
-	otro	2411751	1993	NG:21:P1,16	Islandia	vehículo	-
-	otro	1712741	1993	NG:15:-	Islandia	vehículo	-
-	otro	65/96	1996	B:4:P1,14	Noruega	vehículo	+
-	otro	66/96	1996	B:17:P1,15	Noruega	vehículo	-
-	otro	149/96	1996	B:1,19:P1,5,2	Bélgica	vehículo	+
-	otro	16060	1991	B:4:P1,14	Bélgica	vehículo	-
-	otro	16489	1991	NG:21:P.1,1	Noruega	vehículo	-
-	otro	16990	1991	NG:14:P1,5,2,6	Noruega	vehículo	-
-	otro	2022	1991	NG:4:P1,10	Noruega	vehículo	+
-	otro	M136	1968	B:11:P1,15	EE.UU.	caso	-
-	otro	860060	1988	X	Holanda	caso	-
-	otro	NG H41	1986	B	Noruega	vehículo	-
-	otro	NG G40	1988	B	Noruega	vehículo	-
-	otro	NG4/88	1988	B	Noruega	caso	-
-	otro	EG 327	1985	B	DDR	caso	-
-	otro	EG 328	1985	B	DDR	caso	-
-	otro	3906	1977	B	China	caso	-
-	otro	NG E30	1988	B	Noruega	vehículo	-
-	otro	71/94	1994	Y	Noruega	caso	-
-	otro	DK24	1940	B	Dinamarca	caso	-
-	-	C11	1965	C :16 :P1,7a,1	Alemania	-	+
-	-	pmc8	-	C	-	-	+
-	-	nmb	1968	B:2b:P1,5,2	EE.UU.	caso	+
-	-	8047	1978	B:26:P1,2	EE.UU.	caso	+
-	-	S3446	1972	B:14:P1,23,14	EE.UU.	caso	-
-	-	ISS 749	1996	B:14:P1,13	Italia	caso	-
-	-	ISS 759	1996	C:2b:P1,2	Italia	caso	+
-	-	ISS 832	1997	B:15:P1,7	Italia	caso	+
-	-	ISS 838	1997	C:2a:P1,5,2	Italia	caso	+
-	-	ISS1001	1999	B:14:P1,13	Italia	caso	-
-	-	ISS1024	2000	C:2b:P1,5	Italia	caso	+
-	-	ISS1026	2000	B:4:P1,13	Italia	caso	-
-	-	ISS1071	2000	B:15:P1,7,16	Italia	caso	+
-	-	ISS1102	2000	B:15:P1,4	Italia	caso	-
-	-	ISS1104	2000	B:15:P1,7,16	Italia	caso	+
-	-	ISS1106	2000	B:4:P1,4	Italia	caso	-
-	-	ISS1113	2000	C:2a:P1,5	Italia	caso	+
-	-	N1002/90	-	-	Brasil	-	+
-	-	IMC2135	-	-	Brasil	-	+
-	-	NM001	-	B:4:P1,4	Reino Unido	caso	-
-	-	NM002	-	B:NT:P1,16	Reino Unido	caso	-
-	-	NM004	-	B:NT:P1,14	Reino Unido	caso	-
-	-	NM008	-	B:4:P1,4	Reino Unido	caso	-

ES 2 615 362 T3

(continuación)

ST	ET	Cepa	Año	Tipo de serogrupo: subtipo	País	Enfermedad	Gen <i>NadA</i>
-	-	NM009/10	-	B:4:P1,3,6	Reino Unido	caso	-
-	-	NM021	-	B:4:P1,16	Reino Unido	caso	-
-	-	NM036	-	C:2a:P1,10	Reino Unido	caso	+
-	-	NM037	-	B:2b:P1,10	Reino Unido	caso	+
-	-	NM050	-	B:NT:P1,9	Reino Unido	caso	-
-	-	NM058	-	B:NT:NST	Reino Unido	caso	-
-	-	NM066	-	B:15:P1,7,16	Reino Unido	caso	+
-	-	NM067	-	C:2a:NST	Reino Unido	caso	+
-	-	NM069	-	B:15:P1,7,16	Reino Unido	caso	+
-	-	NM081	-	C:2a:P1,5,2	Reino Unido	caso	+
-	-	NM088	-	C:2a:P1,5,2	Reino Unido	caso	+
-	-	NM092	-	B:4:P1,4	Reino Unido	caso	-
-	-	NM106	-	B:NT:P1,4	Reino Unido	caso	-
-	-	NM107/8	-	B:4:P1,4	Reino Unido	caso	-
-	-	NM117	-	B:21:P1,9	Reino Unido	caso	-
-	-	NM119	-	B:4:P1,15	Reino Unido	caso	+
-	-	NM131	-	B	Reino Unido	caso	-
-	-	NM145	-	C	Reino Unido	caso	+
-	-	NM154	-	C:NT:P1,5,2	Reino Unido	caso	+
-	-	NM156	-	B:15:P1,16	Reino Unido	caso	+
-	-	NM167	-	B	Reino Unido	caso	-
-	-	NM184	-	B:NT:P1,5,2	Reino Unido	caso	-
-	-	NM186	-	B	Reino Unido	caso	-
-	-	NM188	-	B	Reino Unido	caso	+
-	-	NM200	-	B:4:P1,4	Reino Unido	caso	-

TABLA III – LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
1	alelo 1 de 961
2	alelo 2 de 961
3	alelo 3 de 961
4	alelo 1 de 961 (primer –ATG de iniciación)
5	alelo 2 de 961 (primer –ATG de iniciación)
6	alelo 3 de 961 (primer –ATG de iniciación)
7	Alelo variante 2 de 961 en la cepa ISS1024
8	Alelo variante 2 de 961 (primer ATG de iniciación) en la cepa ISS1024
9	Alelo variante 3 de 961 en las cepas 973–1720 e ISS759
10	Alelo variante 3 de 961 (primer ATG de iniciación) en las cepas 973–1720 e ISS759
11	Quimera ½ del alelo 961 (cepa 95330)
12	Quimera ½ del alelo 961 (cepa 95330) (primer ATG de iniciación)
13	Alelo C de 961
14	alelo c de 961 (primer –ATG de iniciación)
15	Secuencia de codificación para la SEQ ID 13
16–31	Cebadores de PCR
32	SEQ ID 650 del documento WO99/24578
33–39	Derivados del dominio de la SEQ ID 32

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NOVARTIS VACCINES Y DIAGNOSTICS SRL
- 5 <120> Adhesinas de meningococos
- <130> P054085WO
- <140> EP
- <141> 26-07-2002
- 10 <150> GB 0118401.9
- <151> 27-07-2001
- <150> GB 0121591.2
- 15 <151> 06-09-2001
- <150> GB 0211025.2
- <151> 14-05-2002
- 20 <160> 39
- <170> SeqWin99, versión 1.03
- <210> 1
- 25 <211> 362
- <212> PRT
- <213> *Neisseria meningitidis*
- <220>
- 30 <221> alelo 1 de NadA
- <400> 1

```

Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Thr
 1                               5                10                15

Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Ser Asp Asp Asp Val Lys Lys
 20                               25                30

Ala Ala Thr Val Ala Ile Val Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile
 35                               40                45

Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Gly Glu Asp Gly
 50                               55                60

Thr Ile Thr Gln Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp
 65                               70                75                80

Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr
 85                               90                95

Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu
 100                              105                110

Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala
 115                              120                125

Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Glu Thr Thr Asn Ala Leu Asn
 130                              135                140

Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn

```

ES 2 615 362 T3

145						150						155				160
Ile	Val	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Val	Asp	
				165					170					175		
Lys	His	Ala	Glu	Ala	Phe	Asn	Asp	Ile	Ala	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Thr	
			180					185					190			
Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Asn	Glu	Ala	Lys	Gln	
		195					200					205				
Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	
	210					215					220					
Glu	Thr	Ala	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Asn	Thr	
225					230				235						240	
Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Asp	Ile	Lys	
				245					250					255		
Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys	Ala	Asp	Ile	Ala	Lys	Asn	Ser	Ala	Arg	
			260					265					270			
Ile	Asp	Ser	Leu	Asp	Lys	Asn	Val	Ala	Asn	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	
		275					280					285				
Gln	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	
	290					295					300					
Asn	Val	Gly	Arg	Phe	Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ser	
305					310					315					320	
Glu	Ser	Ala	Val	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Phe	Arg	Phe	Thr	Glu	Asn	Phe	
				325					330					335		
Ala	Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	
			340					345					350			
Ala	Tyr	His	Val	Gly	Val	Asn	Tyr	Glu	Trp							
		355					360									

<210> 2  
 <211> 398  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

5

<220>  
 <221> alelo 2 de NadA

10

<400>2



ES 2 615 362 T3

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

ES 2 615 362 T3

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

ES 2 615 362 T3

Gly Ser Ser Ala Ala Tyr His Val Gly Val Asn Tyr Glu Trp  
385 390 395

- 5 <210> 3
- <211> 405
- <212> PRT
- <213> *Neisseria meningitidis*
  
- 10 <220>
- <221> alelo 3 de NadA
  
- <400> 3

ES 2 615 362 T3

Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Thr  
1 5 10 15

Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys  
20 25 30

Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile  
35 40 45

Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly  
50 55 60

Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp  
65 70 75 80

Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr  
85 90 95

Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu  
100 105 110

Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala  
115 120 125

Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn  
130 135 140

Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn  
145 150 155 160

Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp  
165 170 175

Lys His Ala Glu Ala Phe Asn Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr  
180 185 190

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

Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala  
210 215 220

Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr  
225 230 235 240

Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys  
245 250 255

Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ser



ES 2 615 362 T3

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

ES 2 615 362 T3

Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Glu Thr Thr Asn Ala  
 130 135 140

Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys  
 145 150 155 160

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

Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp  
 180 185 190

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

Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys  
 210 215 220

Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala  
 225 230 235 240

Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala Val Ala Ala Lys Val Thr Asp  
 245 250 255

Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Ser  
 260 265 270

Ala Arg Ile Asp Ser Leu Asp Lys Asn Val Ala Asn Leu Arg Lys Glu  
 275 280 285

Thr Arg Gln Gly Leu Ala Glu Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu Phe Gln  
 290 295 300

Pro Tyr Asn Val Gly Arg Phe Asn Val Thr Ala Ala Val Gly Gly Tyr  
 305 310 315 320

Lys Ser Glu Ser Ala Val Ala Ile Gly Thr Gly Phe Arg Phe Thr Glu  
 325 330 335

Asn Phe Ala Ala Lys Ala Gly Val Ala Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser  
 340 345 350

Ser Ala Ala Tyr His Val Gly Val Asn Tyr Glu Trp  
 355 360

<210> 5  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

<220>  
 <221> alelo 2 de NadA (primer-ATG de iniciación)

<400> 5

Met Ser Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val  
 20 25 30

ES 2 615 362 T3

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





ES 2 615 362 T3

Met Ser Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu  
1 5 10 15

Ala Thr Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val  
20 25 30

Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln  
35 40 45

Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu  
50 55 60

Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr  
85 90 95

Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala  
100 105 110

Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp  
115 120 125

Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala  
130 135 140

Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys  
145 150 155 160

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

Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp  
180 185 190

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

Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys  
210 215 220

Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala



ES 2 615 362 T3

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

ES 2 615 362 T3

Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu  
 100 105 110

Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala  
 115 120 125

Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr  
 130 135 140

Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys  
 145 150 155 160

Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn  
 165 170 175

Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala  
 180 185 190

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

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

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

Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala  
 245 250 255

Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu Glu Ser Asp Ser Lys Phe Val  
 260 265 270

Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu  
 275 280 285

Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Thr Glu His Gly Thr Arg Leu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Asp Arg Thr Val Ser Asp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Gln Gly Leu  
 305 310 315 320

Ala Glu Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly  
 325 330 335

Arg Phe Asn Val Thr Ala Ala Val Gly Gly Tyr Lys Ser Glu Ser Ala  
 340 345 350

Val Ala Ile Gly Thr Gly Phe Arg Phe Thr Glu Asn Phe Ala Ala Lys  
 355 360 365

Ala Gly Val Ala Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ala Tyr His  
 370 375 380

Val Gly Val Asn Tyr Glu Trp  
 385 390

<210> 8  
 <211> 393  
 <212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<220>

<221> Alelo variante 2 de NadA (primer-ATG de iniciación) en la cepa ISS1024

5

<400> 8

ES 2 615 362 T3

Met Ser Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu  
1 5 10 15

Ala Thr Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val  
20 25 30

Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln  
35 40 45

Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu  
50 55 60

Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr  
85 90 95

Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala  
100 105 110

Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp  
115 120 125

Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn  
130 135 140

Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp  
145 150 155 160

Glu Lys Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala  
165 170 175

Phe Asn Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp  
180 185 190

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

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

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

Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys Asp Asn Ile Ala Lys  
245 250 255

Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu Glu Ser Asp Ser Lys  
260 265 270

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

Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Thr Glu His Gly Thr Arg Leu

ES 2 615 362 T3

290		295		300															
Asn	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	Gln				
305							310				315				320				
Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn				
				325					330					335					
Val	Gly	Arg	Phe	Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ser	Glu				
			340					345					350						
Ser	Ala	Val	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Phe	Arg	Phe	Thr	Glu	Asn	Phe	Ala				
		355					360					365							
Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala				
	370					375					380								
Tyr	His	Val	Gly	Val	Asn	Tyr	Glu	Trp											
385					390														

<210> 9  
 <211> 405  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

5

<220>  
 <221> Alelo variante 3 de NadA en las cepas 973-1720 e ISS759

10

<400> 9



ES 2 615 362 T3

Met Gln His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Thr  
1 5 10 15

Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys  
20 25 30

Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile  
35 40 45

Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly  
50 55 60

Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp  
65 70 75 80

Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr  
85 90 95

Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu  
100 105 110

Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala  
115 120 125

Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn  
130 135 140

Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn  
145 150 155 160

Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp  
165 170 175

ES 2 615 362 T3

Lys His Ala Glu Ala Phe Asn Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr  
 180 185 190

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

Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala  
 210 215 220

Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr  
 225 230 235 240

Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys  
 245 250 255

Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ser  
 260 265 270

Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu Glu Ser Asp Ser Lys Phe Val Arg Ile  
 275 280 285

Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu Ala Ser  
 290 295 300

Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp His Asp Thr Arg Leu Asn Gly Leu Asp  
 305 310 315 320

Lys Thr Val Ser Asp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Gln Gly Leu Ala Glu  
 325 330 335

Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly Arg Phe  
 340 345 350

Asn Val Thr Ala Ala Val Gly Gly Tyr Lys Ser Glu Ser Ala Val Ala  
 355 360 365

Ile Gly Thr Gly Phe Arg Phe Thr Glu Asn Phe Ala Ala Lys Ala Gly  
 370 375 380

Val Ala Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ala Tyr His Val Gly  
 385 390 395 400

Val Asn Tyr Glu Trp  
 405

<210> 10

<211> 407

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<220>

<221 > Alelo variante 3 de NadA (primer-ATG de iniciación) en las cepas 973-1720 e ISS759

<400> 10

Met Ser Met Gln His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val  
 20 25 30

ES 2 615 362 T3

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

ES 2 615 362 T3

Arg Phe Asn Val Thr Ala Ala Val Gly Gly Tyr Lys Ser Glu Ser Ala  
355 360 365

Val Ala Ile Gly Thr Gly Phe Arg Phe Thr Glu Asn Phe Ala Ala Lys  
370 375 380

Ala Gly Val Ala Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ala Tyr His  
385 390 395 400

Val Gly Val Asn Tyr Glu Trp  
405

- 5 <210> 11  
<211> 355  
<212> PRT  
<213> *Neisseria meningitidis*
- 10 <220>  
<221> Quimera 1/2 del alelo NadA (cepa 95330)
- <400> 11

ES 2 615 362 T3

Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Thr  
1 5 10 15

Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys  
20 25 30

Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile  
35 40 45

Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly  
50 55 60

Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp  
65 70 75 80

Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr  
85 90 95

Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu  
100 105 110

Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala  
115 120 125

Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr  
130 135 140

Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys  
145 150 155 160

Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn  
165 170 175

Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala  
180 185 190

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

Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala



ES 2 615 362 T3

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

ES 2 615 362 T3

Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn  
 130 135 140

Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp  
 145 150 155 160

Glu Lys Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala  
 165 170 175

Phe Asn Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp  
 180 185 190

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

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

Lys Ala Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala  
 225 230 235 240

Glu Ala Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr  
 245 250 255

Asn Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Ser Ala Arg Ile Asp Ser Leu Asp  
 260 265 270

Lys Asn Val Ala Asn Leu Arg Lys Glu Thr Arg Gln Gly Leu Ala Glu  
 275 280 285

Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly Arg Phe  
 290 295 300

Asn Val Thr Ala Ala Val Gly Gly Tyr Lys Ser Glu Ser Ala Val Ala  
 305 310 315 320

Ile Gly Thr Gly Phe Arg Phe Thr Glu Asn Phe Ala Ala Lys Ala Gly  
 325 330 335

Val Ala Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ala Tyr His Val Gly  
 340 345 350

Val Asn Tyr Glu Trp  
 355

<210> 13  
 <211> 323  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

<220>  
 <221> Alelo C de NadA

<400> 13

5

10





ES 2 615 362 T3

Ala Lys Ala Ala Leu Val Asn Ser Tyr Asn Asn Thr Gln Asp Ile Asn  
 35 40 45

Gly Phe Thr Val Gly Asp Thr Ile Tyr Asp Ile Lys Asn Asp Lys Ile  
 50 55 60

Thr Lys Lys Glu Ala Thr Glu Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys  
 65 70 75 80

Gly Leu Gly Leu Lys Glu Val Val Ala Gln His Asp Gln Ser Leu Ala  
 85 90 95

Asp Leu Thr Glu Thr Val Asn Glu Asn Ser Glu Ala Leu Val Lys Thr  
 100 105 110

Ala Ala Val Val Asn Asp Ile Ser Ala Asp Val Lys Ala Asn Thr Ala  
 115 120 125

Ala Ile Gly Glu Asn Lys Ala Ala Ile Ala Thr Lys Ala Asp Lys Thr  
 130 135 140

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

Gly Lys Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Lys Ala Glu Val Tyr  
 165 170 175

Thr Lys Gln Glu Ser Asp Asn Arg Phe Val Lys Ile Ser Asp Gly Ile  
 180 185 190

Gly Asn Leu Asn Thr Thr Ala Asn Gly Leu Glu Thr Arg Leu Ala Ala  
 195 200 205

Ala Glu Gln Ser Val Ala Asp His Gly Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu  
 210 215 220

Lys Ser Ile Thr Glu His Gly Thr Arg Leu Asn Gly Leu Asp Arg Thr  
 225 230 235 240

Val Ser Asp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Gln Gly Leu Ala Glu Gln Ala  
 245 250 255

Ala Leu Ser Gly Leu Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly Arg Phe Asn Val  
 260 265 270

Thr Ala Ala Val Gly Gly Tyr Lys Ser Glu Ser Ala Val Ala Ile Gly  
 275 280 285

Thr Gly Phe Arg Phe Thr Glu Asn Phe Ala Ala Lys Ala Gly Val Ala  
 290 295 300

Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ala Tyr His Val Gly Val Asn  
 305 310 315 320

Tyr Glu Trp

<210> 14  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

<220>

<221> Alelo C de NadA (primer-ATG de iniciación)

<400> 14

5

ES 2 615 362 T3

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

ES 2 615 362 T3

Val Ala Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ala Tyr His Val Gly  
 305 310 315 320

Val Asn Tyr Glu Trp  
 325

5 <210> 15  
 <211> 972  
 <212> ADN  
 <213> *Neisseria meningitidis*

10 <220>  
 <221> Secuencia de codificación para la SEQ ID 13

<400> 15

```

atgaaacact ttccatccaa agtactgacc gcagccatcc ttgcegcct cagcggcagc 60
gcaatggcag acaacgcccc caccgctgac gaaattgcca aagccgcct agttaactcc 120
tacaacaata cccaagacat caacggattc acagtcggag acaccatcta cgacattaaa 180
aatgacaaga ttaccaaaaa agaagcaaca gaagccgatg ttgaagctga cgactttaa 240
ggctctgggtc tgaagaagt cgtggctcaa cagaccaa gccttgccga cctgaccgaa 300
accgtcaatg aaaacagcga agcattggta aaaaccgcg cggttgtcaa tgacatcagt 360
gccgatgtca aagccaacac agcagctatc ggggaaaaca aagctgctat cgctacaaaa 420
gcagacaaaa ccgaactgga taaagtgtcc ggcaaagtaa ccgagaacga gactgctatc 480
ggtaaaaaag caaacagtgc cgacgtgtac actaaagtct aggtgtacac caaacaagag 540
tctgacaaca gatttgtcaa aattagtgac ggaatcggta atctgaacac tactgccaat 600
ggattggaga cacgcttggc cgctgcccga caatccgttg cagaccacgg tacgcgcttg 660
gcttctgccg aaaaatccat taccgaacac ggtacgcgcc tgaacggttt ggatagaaca 720
gtgtcagacc tgcgtaaaga aaccgcgcaa ggccttgca aacaagccgc gctctccggt 780
ctgttccaac cttacaacgt gggtcggttc aatgtaacgg ctgcagtcgg cggctacaaa 840
tccgaatcgg cagtcgccat cggtaaccgg tccgcgttta ccgaaaactt tgccgccaaa 900
gcaggcgtgg cagtcggcac ttcgctccggt tcttccgcag cctaccatgt cggcgtcaat 960
tacgagtggc aa 972
    
```

15 <210> 16  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador directo

25 <400> 16  
 gtcgacgtcc tcgattacga ag 22

30 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso

35 <400> 17  
 cgaggcgatt gtcaaaccgt tc 22

40 <210> 18  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 615 362 T3

<223> Cebador directo

<400> 18  
cgcgatccg ctacggaca cactatttc gg 32

5

<210> 19  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador inverso

<400> 19  
cccgtcggag ccagcggtag cctaattg 29

15

<210> 20  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Cebador directo

<400> 20  
cgcgatccg ctacaaaac aaccgacaaa cgg 33

25

<210> 21  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Cebador inverso

<400> 21  
cccgtcggag ttaccagcgg tagcctaatt tg 32

35

<210> 22  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Cebador de mutagénesis

<400> 22  
ctcattggc gacgctggct caccaatgt tatctatgat g 41

45

<210> 23  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> Cebador de mutagénesis

<400> 23  
catcatagat aaacattggt gagccagcgt cgccaatga g 41

55

<210> 24  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60

<220>

65

ES 2 615 362 T3

<223> Cebador directo  
 <400> 24  
 cgcgatccg ctagcgaca cactatttc gg 32  
 5  
 <210> 25  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador inverso  
 <400> 25  
 15 cccgctcgag cagcgcgca aggctt 26  
 <210> 26  
 <211> 124  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo  
 25 <400> 26  
  
**gggaattcca tatgaaagcc aaacgtttta aaattaacgc catatcctta tccatctttc 60**  
**ttgcctatgc ccttacgcca tactcagaag cggctagcga caacgcgcaa agccttgacg 120**  
**cgct 124**  
 <210> 27  
 30 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Cebador inverso  
 <400> 27  
 cccgctcgag ttaccagcg tagcctaatt tg 32  
 40 <210> 28  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador defectuoso  
 <400> 28  
 50 gctctagagg aggctgtcga aacc 24  
 <210> 29  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador defectuoso  
 <400> 29  
 60 tccccgggc gggtgtcgt ttgtcg 26  
 <210> 30  
 <211> 27

ES 2 615 362 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Cebador defectuoso

<400> 30  
 tcccccgggg cgggcatcaa attaggc 27

10 <210>31  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador defectuoso

<400> 31  
 cccgctcgag cgcaaccgtc cgctgac 27

20 <210> 32  
 <211> 1457  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

25 <220>  
 <221> SEQ ID 650 del documento WO99/24578

30 <400> 32

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



ES 2 615 362 T3

Arg Asn Pro Asp Gln His Arg Phe Thr Tyr Lys Ile Val Lys Arg Asn  
 130 135 140  
 Asn Tyr Lys Ala Gly Thr Lys Gly His Pro Tyr Gly Gly Asp Tyr His  
 145 150 155 160  
 Met Pro Arg Leu His Lys Phe Val Thr Asp Ala Glu Pro Val Glu Met  
 165 170 175  
 Thr Ser Tyr Met Asp Gly Arg Lys Tyr Ile Asp Gln Asn Asn Tyr Pro  
 180 185 190  
 Asp Arg Val Arg Ile Gly Ala Gly Arg Gln Tyr Trp Arg Ser Asp Glu  
 195 200 205  
 Asp Glu Pro Asn Asn Arg Glu Ser Ser Tyr His Ile Ala Ser Ala Tyr  
 210 215 220  
 Ser Trp Leu Val Gly Gly Asn Thr Phe Ala Gln Asn Gly Ser Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Thr Val Asn Leu Gly Ser Glu Lys Ile Lys His Ser Pro Tyr Gly  
 245 250 255  
 Phe Leu Pro Thr Gly Gly Ser Phe Gly Asp Ser Gly Ser Pro Met Phe  
 260 265 270  
 Ile Tyr Asp Ala Gln Lys Gln Lys Trp Leu Ile Asn Gly Val Leu Gln  
 275 280 285  
 Thr Gly Asn Pro Tyr Ile Gly Lys Ser Asn Gly Phe Gln Leu Val Arg  
 290 295 300  
 Lys Asp Trp Phe Tyr Asp Glu Ile Phe Ala Gly Asp Thr His Ser Val  
 305 310 315 320  
 Phe Tyr Glu Pro Arg Gln Asn Gly Lys Tyr Ser Phe Asn Asp Asp Asn  
 325 330 335  
 Asn Gly Thr Gly Lys Ile Asn Ala Lys His Glu His Asn Ser Leu Pro  
 340 345 350  
 Asn Arg Leu Lys Thr Arg Thr Val Gln Leu Phe Asn Val Ser Leu Ser  
 355 360 365  
 Glu Thr Ala Arg Glu Pro Val Tyr His Ala Ala Gly Gly Val Asn Ser  
 370 375 380  
 Tyr Arg Pro Arg Leu Asn Asn Gly Glu Asn Ile Ser Phe Ile Asp Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Lys Gly Glu Leu Ile Leu Thr Ser Asn Ile Asn Gln Gly Ala Gly  
 405 410 415  
 Gly Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Phe Thr Val Ser Pro Glu Asn Asn Glu  
 420 425 430  
 Thr Trp Gln Gly Ala Gly Val His Ile Ser Glu Asp Ser Thr Val Thr  
 435 440 445

ES 2 615 362 T3

Trp Lys Val Asn Gly Val Ala Asn Asp Arg Leu Ser Lys Ile Gly Lys  
 450 455 460  
 Gly Thr Leu His Val Gln Ala Lys Gly Glu Asn Gln Gly Ser Ile Ser  
 465 470 475 480  
 Val Gly Asp Gly Thr Val Ile Leu Asp Gln Gln Ala Asp Asp Lys Gly  
 485 490 495  
 Lys Lys Gln Ala Phe Ser Glu Ile Gly Leu Val Ser Gly Arg Gly Thr  
 500 505 510  
 Val Gln Leu Asn Ala Asp Asn Gln Phe Asn Pro Asp Lys Leu Tyr Phe  
 515 520 525  
 Gly Phe Arg Gly Gly Arg Leu Asp Leu Asn Gly His Ser Leu Ser Phe  
 530 535 540  
 His Arg Ile Gln Asn Thr Asp Glu Gly Ala Met Ile Val Asn His Asn  
 545 550 555 560  
 Gln Asp Lys Glu Ser Thr Val Thr Ile Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ala  
 565 570 575  
 Thr Thr Gly Asn Asn Asn Ser Leu Asp Ser Lys Lys Glu Ile Ala Tyr  
 580 585 590  
 Asn Gly Trp Phe Gly Glu Lys Asp Thr Thr Lys Thr Asn Gly Arg Leu  
 595 600 605  
 Asn Leu Val Tyr Gln Pro Ala Ala Glu Asp Arg Thr Leu Leu Leu Ser  
 610 615 620  
 Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Asn Ile Thr Gln Thr Asn Gly Lys Leu  
 625 630 635 640  
 Phe Phe Ser Gly Arg Pro Thr Pro His Ala Tyr Asn His Leu Asn Asp  
 645 650 655  
 His Trp Ser Gln Lys Glu Gly Ile Pro Arg Gly Glu Ile Val Trp Asp  
 660 665 670  
 Asn Asp Trp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Ala Glu Asn Phe Gln Ile Lys  
 675 680 685  
 Gly Gly Gln Ala Val Val Ser Arg Asn Val Ala Lys Val Lys Gly Asp  
 690 695 700  
 Trp His Leu Ser Asn His Ala Gln Ala Val Phe Gly Val Ala Pro His  
 705 710 715 720  
 Gln Ser His Thr Ile Cys Thr Arg Ser Asp Trp Thr Gly Leu Thr Asn  
 725 730 735  
 Cys Val Glu Lys Thr Ile Thr Asp Asp Lys Val Ile Ala Ser Leu Thr  
 740 745 750  
 Lys Thr Asp Ile Ser Gly Asn Val Asp Leu Ala Asp His Ala His Leu  
 755 760 765  
 Asn Leu Thr Gly Leu Ala Thr Leu Asn Gly Asn Leu Ser Ala Asn Gly

ES 2 615 362 T3

770					775					780					
Asp	Thr	Arg	Tyr	Thr	Val	Ser	His	Asn	Ala	Thr	Gln	Asn	Gly	Asn	Leu
785					790					795					800
Ser	Leu	Val	Gly	Asn	Ala	Gln	Ala	Thr	Phe	Asn	Gln	Ala	Thr	Leu	Asn
				805					810					815	
Gly	Asn	Thr	Ser	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Asp	His
			820					825					830		
Ala	Val	Gln	Asn	Gly	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Asn	Ala	Lys	Ala	Asn
		835					840					845			
Val	Ser	His	Ser	Ala	Leu	Asn	Gly	Asn	Val	Ser	Leu	Ala	Asp	Lys	Ala
	850					855					860				
Val	Phe	His	Phe	Glu	Ser	Ser	Arg	Phe	Thr	Gly	Gln	Ile	Ser	Gly	Gly
865					870					875					880
Lys	Asp	Thr	Ala	Leu	His	Leu	Lys	Asp	Ser	Glu	Trp	Thr	Leu	Pro	Ser
				885					890					895	
Gly	Thr	Glu	Leu	Gly	Asn	Leu	Asn	Leu	Asp	Asn	Ala	Thr	Ile	Thr	Leu
			900					905					910		
Asn	Ser	Ala	Tyr	Arg	His	Asp	Ala	Ala	Gly	Ala	Gln	Thr	Gly	Ser	Ala
		915					920					925			
Thr	Asp	Ala	Pro	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu
	930					935					940				
Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Thr	Ser	Val	Glu	Ser	Arg	Phe	Asn	Thr	Leu	Thr
945					950					955					960
Val	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Gly	Gln	Gly	Thr	Phe	Arg	Phe	Met	Ser	Glu
				965					970					975	
Leu	Phe	Gly	Tyr	Arg	Ser	Asp	Lys	Leu	Lys	Leu	Ala	Glu	Ser	Ser	Glu
			980					985					990		
Gly	Thr	Tyr	Thr	Leu	Ala	Val	Asn	Asn	Thr	Gly	Asn	Glu	Pro	Ala	Ser
		995					1000					1005			
Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Asp	Asn	Lys	Pro	Leu	Ser
	1010					1015					1020				
Glu	Asn	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Gln	Asn	Glu	His	Val	Asp	Ala	Gly	Ala
1025					1030					1035					1040
Trp	Arg	Tyr	Gln	Leu	Ile	Arg	Lys	Asp	Gly	Glu	Phe	Arg	Leu	His	Asn
				1045					1050					1055	
Pro	Val	Lys	Glu	Gln	Glu	Leu	Ser	Asp	Lys	Leu	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala
			1060					1065					1070		
Lys	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Asp	Asn	Ala	Gln	Ser	Leu	Asp	Ala	Leu	Ile
		1075					1080					1085			
Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Glu	Lys	Thr	Glu	Ser	Val	Ala	Glu	Pro
		1090				1095					1100				

ES 2 615 362 T3

Ala Arg Gln Ala Gly Gly Glu Asn Val Gly Ile Met Gln Ala Glu Glu  
1105 1110 1115 1120

Glu Lys Lys Arg Val Gln Ala Asp Lys Asp Thr Ala Leu Ala Lys Gln  
1125 1130 1135

Arg Glu Ala Glu Thr Arg Pro Ala Thr Thr Ala Phe Pro Arg Ala Arg  
1140 1145 1150

Arg Ala Arg Arg Asp Leu Pro Gln Leu Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln  
1155 1160 1165

Pro Gln Arg Asp Leu Ile Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Gly Leu Ser Glu  
1170 1175 1180

Phe Ser Ala Thr Leu Asn Ser Val Phe Ala Val Gln Asp Glu Leu Asp  
1185 1190 1195 1200

Arg Val Phe Ala Glu Asp Arg Arg Asn Ala Val Trp Thr Ser Gly Ile  
1205 1210 1215

Arg Asp Thr Lys His Tyr Arg Ser Gln Asp Phe Arg Ala Tyr Arg Gln  
1220 1225 1230

Gln Thr Asp Leu Arg Gln Ile Gly Met Gln Lys Asn Leu Gly Ser Gly  
1235 1240 1245

Arg Val Gly Ile Leu Phe Ser His Asn Arg Thr Glu Asn Thr Phe Asp  
1250 1255 1260

Asp Gly Ile Gly Asn Ser Ala Arg Leu Ala His Gly Ala Val Phe Gly  
1265 1270 1275 1280

Gln Tyr Gly Ile Asp Arg Phe Tyr Ile Gly Ile Ser Ala Gly Ala Gly  
1285 1290 1295

Phe Ser Ser Gly Ser Leu Ser Asp Gly Ile Gly Gly Lys Ile Arg Arg  
1300 1305 1310

Arg Val Leu His Tyr Gly Ile Gln Ala Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Gly  
1315 1320 1325

Gly Phe Gly Ile Glu Pro His Ile Gly Ala Thr Arg Tyr Phe Val Gln  
1330 1335 1340

Lys Ala Asp Tyr Arg Tyr Glu Asn Val Asn Ile Ala Thr Pro Gly Leu  
1345 1350 1355 1360

Ala Phe Asn Arg Tyr Arg Ala Gly Ile Lys Ala Asp Tyr Ser Phe Lys  
1365 1370 1375

Pro Ala Gln His Ile Ser Ile Thr Pro Tyr Leu Ser Leu Ser Tyr Thr  
1380 1385 1390

Asp Ala Ala Ser Gly Lys Val Arg Thr Arg Val Asn Thr Ala Val Leu  
1395 1400 1405

Ala Gln Asp Phe Gly Lys Thr Arg Ser Ala Glu Trp Gly Val Asn Ala  
1410 1415 1420



ES 2 615 362 T3

Met Lys Thr Thr Asp Lys Arg Thr Thr Glu Thr His Arg Lys Ala Pro  
1 5 10 15

Lys Thr Gly Arg Ile Arg Phe Ser Pro Ala Tyr Leu Ala Ile Cys Leu  
20 25 30

Ser Phe Gly Ile Leu Pro Gln Ala Trp Ala Gly His Thr Tyr Phe Gly  
35 40 45

Ile Asn Tyr Gln Tyr Tyr Arg Asp Phe Ala Glu Asn Lys Gly Lys Phe  
50 55 60

Ala Val Gly Ala Lys Asp Ile Glu Val Tyr Asn Lys Lys Gly Glu Leu  
65 70 75 80

Val Gly Lys Ser Met Thr Lys Ala Pro Met Ile Asp Phe Ser Val Val  
85 90 95

Ser Arg Asn Gly Val Ala Ala Leu Val Gly Asp Gln Tyr Ile Val Ser  
100 105 110

Val Ala His Asn Gly Gly Tyr Asn Asn Val Asp Phe Gly Ala Glu Gly  
115 120 125

Arg Asn Pro Asp Gln His Arg Phe Thr Tyr Lys Ile Val Lys Arg Asn  
130 135 140

Asn Tyr Lys Ala Gly Thr Lys Gly His Pro Tyr Gly Gly Asp Tyr His  
145 150 155 160

Met Pro Arg Leu His Lys Phe Val Thr Asp Ala Glu Pro Val Glu Met  
165 170 175

Thr Ser Tyr Met Asp Gly Arg Lys Tyr Ile Asp Gln Asn Asn Tyr Pro  
180 185 190

Asp Arg Val Arg Ile Gly Ala Gly Arg Gln Tyr Trp Arg Ser Asp Glu  
195 200 205

Asp Glu Pro Asn Asn Arg Glu Ser Ser Tyr His Ile Ala Ser Ala Tyr  
210 215 220

Ser Trp Leu Val Gly Gly Asn Thr Phe Ala Gln Asn Gly Ser Gly Gly

ES 2 615 362 T3

225					230						235					240
Gly	Thr	Val	Asn	Leu	Gly	Ser	Glu	Lys	Ile	Lys	His	Ser	Pro	Tyr	Gly	
				245					250						255	
Phe	Leu	Pro	Thr	Gly	Gly	Ser	Phe	Gly	Asp	Ser	Gly	Ser	Pro	Met	Phe	
			260					265					270			
Ile	Tyr	Asp	Ala	Gln	Lys	Gln	Lys	Trp	Leu	Ile	Asn	Gly	Val	Leu	Gln	
		275					280					285				
Thr	Gly	Asn	Pro	Tyr	Ile	Gly	Lys	Ser	Asn	Gly	Phe	Gln	Leu	Val	Arg	
	290					295					300					
Lys	Asp	Trp	Phe	Tyr	Asp	Glu	Ile	Phe	Ala	Gly	Asp	Thr	His	Ser	Val	
305					310					315					320	
Phe	Tyr	Glu	Pro	Arg	Gln	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Asn	Asp	Asp	Asn	
				325					330					335		
Asn	Gly	Thr	Gly	Lys	Ile	Asn	Ala	Lys	His	Glu	His	Asn	Ser	Leu	Pro	
			340					345					350			
Asn	Arg	Leu	Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Gln	Leu	Phe	Asn	Val	Ser	Leu	Ser	
		355					360					365				
Glu	Thr	Ala	Arg	Glu	Pro	Val	Tyr	His	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Asn	Ser	
	370					375					380					
Tyr	Arg	Pro	Arg	Leu	Asn	Asn	Gly	Glu	Asn	Ile	Ser	Phe	Ile	Asp	Glu	
385					390					395				400		
Gly	Lys	Gly	Glu	Leu	Ile	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Gln	Gly	Ala	Gly	
				405					410					415		
Gly	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Asp	Phe	Thr	Val	Ser	Pro	Glu	Asn	Asn	Glu	
			420					425					430			
Thr	Trp	Gln	Gly	Ala	Gly	Val	His	Ile	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr	Val	Thr	
		435					440					445				
Trp	Lys	Val	Asn	Gly	Val	Ala	Asn	Asp	Arg	Leu	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	
	450					455					460					
Gly	Thr	Leu	His	Val	Gln	Ala	Lys	Gly	Glu	Asn	Gln	Gly	Ser	Ile	Ser	
465					470					475					480	
Val	Gly	Asp	Gly	Thr	Val	Ile	Leu	Asp	Gln	Gln	Ala	Asp	Asp	Lys	Gly	
				485					490					495		
Lys	Lys	Gln	Ala	Phe	Ser	Glu	Ile	Gly	Leu	Val	Ser	Gly	Arg	Gly	Thr	
			500					505					510			
Val	Gln	Leu	Asn	Ala	Asp	Asn	Gln	Phe	Asn	Pro	Asp	Lys	Leu	Tyr	Phe	
		515					520					525				
Gly	Phe	Arg	Gly	Gly	Arg	Leu	Asp	Leu	Asn	Gly	His	Ser	Leu	Ser	Phe	
	530					535					540					
His	Arg	Ile	Gln	Asn	Thr	Asp	Glu	Gly	Ala	Met	Ile	Val	Asn	His	Asn	
545					550					555					560	

ES 2 615 362 T3

Gln Asp Lys Glu Ser Thr Val Thr Ile Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ala  
565 570 575

Thr Thr Gly Asn Asn Asn Ser Leu Asp Ser Lys Lys Glu Ile Ala Tyr  
580 585 590

Asn Gly Trp Phe Gly Glu Lys Asp Thr Thr Lys Thr Asn Gly Arg Leu  
595 600 605

Asn Leu Val Tyr Gln Pro Ala Ala Glu Asp Arg Thr Leu Leu Leu Ser  
610 615 620

Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Asn Ile Thr Gln Thr Asn Gly Lys Leu  
625 630 635 640

Phe Phe Ser Gly Arg Pro Thr Pro His Ala Tyr Asn His Leu Asn Asp  
645 650 655

His Trp Ser Gln Lys Glu Gly Ile Pro Arg Gly Glu Ile Val Trp Asp  
660 665 670

Asn Asp Trp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Ala Glu Asn Phe Gln Ile Lys  
675 680 685

Gly Gly Gln Ala Val Val Ser Arg Asn Val Ala Lys Val Lys Gly Asp  
690 695 700

Trp His Leu Ser Asn His Ala Gln Ala Val Phe Gly Val Ala Pro His  
705 710 715 720

Gln Ser His Thr Ile Cys Thr Arg Ser Asp Trp Thr Gly Leu Thr Asn  
725 730 735

Cys Val Glu Lys Thr Ile Thr Asp Asp Lys Val Ile Ala Ser Leu Thr  
740 745 750

Lys Thr Asp Ile Ser Gly Asn Val Asp Leu Ala Asp His Ala His Leu  
755 760 765

Asn Leu Thr Gly Leu Ala Thr Leu Asn Gly Asn Leu Ser Ala Asn Gly  
770 775 780

Asp Thr Arg Tyr Thr Val Ser His Asn Ala Thr Gln Asn Gly Asn Leu  
785 790 795 800

Ser Leu Val Gly Asn Ala Gln Ala Thr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn  
805 810 815

Gly Asn Thr Ser Ala Ser Gly Asn Ala Ser Phe Asn Leu Ser Asp His  
820 825 830

Ala Val Gln Asn Gly Ser Leu Thr Leu Ser Gly Asn Ala Lys Ala Asn  
835 840 845

Val Ser His Ser Ala Leu Asn Gly Asn Val Ser Leu Ala Asp Lys Ala  
850 855 860

Val Phe His Phe Glu Ser Ser Arg Phe Thr Gly Gln Ile Ser Gly Gly  
865 870 875 880



ES 2 615 362 T3

Lys Asp Thr Ala Leu His Leu Lys Asp Ser Glu Trp Thr Leu Pro Ser  
885 890 895

Gly Thr Glu Leu Gly Asn Leu Asn Leu Asp Asn Ala Thr Ile Thr Leu  
900 905 910

Asn Ser Ala Tyr Arg His Asp Ala Ala Gly Ala Gln Thr Gly Ser Ala  
915 920 925

Thr Asp Ala Pro Arg Arg Arg Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Leu  
930 935 940

Ser Val Thr Pro Pro Thr Ser Val Glu Ser Arg Phe  
945 950 955

- <210> 34
- <211> 1178
- <212> PRT
- <213> *Neisseria meningitidis*
  
- <220>
- <221> Derivado del dominio de App
  
- <400> 34

ES 2 615 362 T3

Met Lys Thr Thr Asp Lys Arg Thr Thr Glu Thr His Arg Lys Ala Pro  
1 5 10 15

Lys Thr Gly Arg Ile Arg Phe Ser Pro Ala Tyr Leu Ala Ile Cys Leu  
20 25 30

Ser Phe Gly Ile Leu Pro Gln Ala Trp Ala Gly His Thr Tyr Phe Gly  
35 40 45

Ile Asn Tyr Gln Tyr Tyr Arg Asp Phe Ala Glu Asn Lys Gly Lys Phe  
50 55 60

Ala Val Gly Ala Lys Asp Ile Glu Val Tyr Asn Lys Lys Gly Glu Leu  
65 70 75 80

Val Gly Lys Ser Met Thr Lys Ala Pro Met Ile Asp Phe Ser Val Val  
85 90 95

Ser Arg Asn Gly Val Ala Ala Leu Val Gly Asp Gln Tyr Ile Val Ser  
100 105 110

Val Ala His Asn Gly Gly Tyr Asn Asn Val Asp Phe Gly Ala Glu Gly  
115 120 125

Arg Asn Pro Asp Gln His Arg Phe Thr Tyr Lys Ile Val Lys Arg Asn  
130 135 140

Asn Tyr Lys Ala Gly Thr Lys Gly His Pro Tyr Gly Gly Asp Tyr His  
145 150 155 160

Met Pro Arg Leu His Lys Phe Val Thr Asp Ala Glu Pro Val Glu Met  
165 170 175

Thr Ser Tyr Met Asp Gly Arg Lys Tyr Ile Asp Gln Asn Asn Tyr Pro  
180 185 190

Asp Arg Val Arg Ile Gly Ala Gly Arg Gln Tyr Trp Arg Ser Asp Glu

ES 2 615 362 T3

	195						200						205			
Asp	Glu	Pro	Asn	Asn	Arg	Glu	Ser	Ser	Tyr	His	Ile	Ala	Ser	Ala	Tyr	
	210						215						220			
Ser	Trp	Leu	Val	Gly	Gly	Asn	Thr	Phe	Ala	Gln	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly	
	225					230						235			240	
Gly	Thr	Val	Asn	Leu	Gly	Ser	Glu	Lys	Ile	Lys	His	Ser	Pro	Tyr	Gly	
				245						250				255		
Phe	Leu	Pro	Thr	Gly	Gly	Ser	Phe	Gly	Asp	Ser	Gly	Ser	Pro	Met	Phe	
			260					265					270			
Ile	Tyr	Asp	Ala	Gln	Lys	Gln	Lys	Trp	Leu	Ile	Asn	Gly	Val	Leu	Gln	
		275					280					285				
Thr	Gly	Asn	Pro	Tyr	Ile	Gly	Lys	Ser	Asn	Gly	Phe	Gln	Leu	Val	Arg	
	290						295					300				
Lys	Asp	Trp	Phe	Tyr	Asp	Glu	Ile	Phe	Ala	Gly	Asp	Thr	His	Ser	Val	
	305				310						315				320	
Phe	Tyr	Glu	Pro	Arg	Gln	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Asn	Asp	Asp	Asn	
				325						330					335	
Asn	Gly	Thr	Gly	Lys	Ile	Asn	Ala	Lys	His	Glu	His	Asn	Ser	Leu	Pro	
			340					345					350			
Asn	Arg	Leu	Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Gln	Leu	Phe	Asn	Val	Ser	Leu	Ser	
		355					360					365				
Glu	Thr	Ala	Arg	Glu	Pro	Val	Tyr	His	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Asn	Ser	
	370						375					380				
Tyr	Arg	Pro	Arg	Leu	Asn	Asn	Gly	Glu	Asn	Ile	Ser	Phe	Ile	Asp	Glu	
	385				390						395				400	
Gly	Lys	Gly	Glu	Leu	Ile	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Gln	Gly	Ala	Gly	
				405						410				415		
Gly	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Asp	Phe	Thr	Val	Ser	Pro	Glu	Asn	Asn	Glu	
			420					425					430			
Thr	Trp	Gln	Gly	Ala	Gly	Val	His	Ile	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr	Val	Thr	
		435						440					445			
Trp	Lys	Val	Asn	Gly	Val	Ala	Asn	Asp	Arg	Leu	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	
	450					455						460				
Gly	Thr	Leu	His	Val	Gln	Ala	Lys	Gly	Glu	Asn	Gln	Gly	Ser	Ile	Ser	
	465				470						475				480	
Val	Gly	Asp	Gly	Thr	Val	Ile	Leu	Asp	Gln	Gln	Ala	Asp	Asp	Lys	Gly	
				485					490					495		
Lys	Lys	Gln	Ala	Phe	Ser	Glu	Ile	Gly	Leu	Val	Ser	Gly	Arg	Gly	Thr	
			500					505					510			
Val	Gln	Leu	Asn	Ala	Asp	Asn	Gln	Phe	Asn	Pro	Asp	Lys	Leu	Tyr	Phe	
		515					520						525			

ES 2 615 362 T3

Gly Phe Arg Gly Gly Arg Leu Asp Leu Asn Gly His Ser Leu Ser Phe  
 530 535 540  
 His Arg Ile Gln Asn Thr Asp Glu Gly Ala Met Ile Val Asn His Asn  
 545 550 555 560  
 Gln Asp Lys Glu Ser Thr Val Thr Ile Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ala  
 565 570 575  
 Thr Thr Gly Asn Asn Asn Ser Leu Asp Ser Lys Lys Glu Ile Ala Tyr  
 580 585 590  
 Asn Gly Trp Phe Gly Glu Lys Asp Thr Thr Lys Thr Asn Gly Arg Leu  
 595 600 605  
 Asn Leu Val Tyr Gln Pro Ala Ala Glu Asp Arg Thr Leu Leu Leu Ser  
 610 615 620  
 Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Asn Ile Thr Gln Thr Asn Gly Lys Leu  
 625 630 635 640  
 Phe Phe Ser Gly Arg Pro Thr Pro His Ala Tyr Asn His Leu Asn Asp  
 645 650 655  
 His Trp Ser Gln Lys Glu Gly Ile Pro Arg Gly Glu Ile Val Trp Asp  
 660 665 670  
 Asn Asp Trp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Ala Glu Asn Phe Gln Ile Lys  
 675 680 685  
 Gly Gly Gln Ala Val Val Ser Arg Asn Val Ala Lys Val Lys Gly Asp  
 690 695 700  
 Trp His Leu Ser Asn His Ala Gln Ala Val Phe Gly Val Ala Pro His  
 705 710 715 720  
 Gln Ser His Thr Ile Cys Thr Arg Ser Asp Trp Thr Gly Leu Thr Asn  
 725 730 735  
 Cys Val Glu Lys Thr Ile Thr Asp Asp Lys Val Ile Ala Ser Leu Thr  
 740 745 750  
 Lys Thr Asp Ile Ser Gly Asn Val Asp Leu Ala Asp His Ala His Leu  
 755 760 765  
 Asn Leu Thr Gly Leu Ala Thr Leu Asn Gly Asn Leu Ser Ala Asn Gly  
 770 775 780  
 Asp Thr Arg Tyr Thr Val Ser His Asn Ala Thr Gln Asn Gly Asn Leu  
 785 790 795 800  
 Ser Leu Val Gly Asn Ala Gln Ala Thr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn  
 805 810 815  
 Gly Asn Thr Ser Ala Ser Gly Asn Ala Ser Phe Asn Leu Ser Asp His  
 820 825 830  
 Ala Val Gln Asn Gly Ser Leu Thr Leu Ser Gly Asn Ala Lys Ala Asn  
 835 840 845

ES 2 615 362 T3

Val Ser His Ser Ala Leu Asn Gly Asn Val Ser Leu Ala Asp Lys Ala  
 850 855 860  
 Val Phe His Phe Glu Ser Ser Arg Phe Thr Gly Gln Ile Ser Gly Gly  
 865 870 875 880  
 Lys Asp Thr Ala Leu His Leu Lys Asp Ser Glu Trp Thr Leu Pro Ser  
 885 890 895  
 Gly Thr Glu Leu Gly Asn Leu Asn Leu Asp Asn Ala Thr Ile Thr Leu  
 900 905 910  
 Asn Ser Ala Tyr Arg His Asp Ala Ala Gly Ala Gln Thr Gly Ser Ala  
 915 920 925  
 Thr Asp Ala Pro Arg Arg Arg Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Leu  
 930 935 940  
 Ser Val Thr Pro Pro Thr Ser Val Glu Ser Arg Phe Asn Thr Leu Thr  
 945 950 955 960  
 Val Asn Gly Lys Leu Asn Gly Gln Gly Thr Phe Arg Phe Met Ser Glu  
 965 970 975  
 Leu Phe Gly Tyr Arg Ser Asp Lys Leu Lys Leu Ala Glu Ser Ser Glu  
 980 985 990  
 Gly Thr Tyr Thr Leu Ala Val Asn Asn Thr Gly Asn Glu Pro Ala Ser  
 995 1000 1005  
 Leu Glu Gln Leu Thr Val Val Glu Gly Lys Asp Asn Lys Pro Leu Ser  
 1010 1015 1020  
 Glu Asn Leu Asn Phe Thr Leu Gln Asn Glu His Val Asp Ala Gly Ala  
 1025 1030 1035 1040  
 Trp Arg Tyr Gln Leu Ile Arg Lys Asp Gly Glu Phe Arg Leu His Asn  
 1045 1050 1055  
 Pro Val Lys Glu Gln Glu Leu Ser Asp Lys Leu Gly Lys Ala Glu Ala  
 1060 1065 1070  
 Lys Lys Gln Ala Glu Lys Asp Asn Ala Gln Ser Leu Asp Ala Leu Ile  
 1075 1080 1085  
 Ala Ala Gly Arg Asp Ala Val Glu Lys Thr Glu Ser Val Ala Glu Pro  
 1090 1095 1100  
 Ala Arg Gln Ala Gly Gly Glu Asn Val Gly Ile Met Gln Ala Glu Glu  
 1105 1110 1115 1120  
 Glu Lys Lys Arg Val Gln Ala Asp Lys Asp Thr Ala Leu Ala Lys Gln  
 1125 1130 1135  
 Arg Glu Ala Glu Thr Arg Pro Ala Thr Thr Ala Phe Pro Arg Ala Arg  
 1140 1145 1150  
 Arg Ala Arg Arg Asp Leu Pro Gln Leu Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln  
 1155 1160 1165  
 Pro Gln Arg Asp Leu Ile Ser Arg Tyr Ala

**1170**

**1175**

5  
<210> 35  
<211> 914  
<212> PRT  
<213> *Neisseria meningitidis*

10  
<220>  
<221> Derivado del dominio de App  
<400> 35

ES 2 615 362 T3

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

ES 2 615 362 T3

Gly Asp Thr His Ser Val Phe Tyr Glu Pro Arg Gln Asn Gly Lys Tyr  
 275 280 285  
 Ser Phe Asn Asp Asp Asn Asn Gly Thr Gly Lys Ile Asn Ala Lys His  
 290 295 300  
 Glu His Asn Ser Leu Pro Asn Arg Leu Lys Thr Arg Thr Val Gln Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Asn Val Ser Leu Ser Glu Thr Ala Arg Glu Pro Val Tyr His Ala  
 325 330 335  
 Ala Gly Gly Val Asn Ser Tyr Arg Pro Arg Leu Asn Asn Gly Glu Asn  
 340 345 350  
 Ile Ser Phe Ile Asp Glu Gly Lys Gly Glu Leu Ile Leu Thr Ser Asn  
 355 360 365  
 Ile Asn Gln Gly Ala Gly Gly Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Phe Thr Val  
 370 375 380  
 Ser Pro Glu Asn Asn Glu Thr Trp Gln Gly Ala Gly Val His Ile Ser  
 385 390 395 400  
 Glu Asp Ser Thr Val Thr Trp Lys Val Asn Gly Val Ala Asn Asp Arg  
 405 410 415  
 Leu Ser Lys Ile Gly Lys Gly Thr Leu His Val Gln Ala Lys Gly Glu  
 420 425 430  
 Asn Gln Gly Ser Ile Ser Val Gly Asp Gly Thr Val Ile Leu Asp Gln  
 435 440 445  
 Gln Ala Asp Asp Lys Gly Lys Lys Gln Ala Phe Ser Glu Ile Gly Leu  
 450 455 460  
 Val Ser Gly Arg Gly Thr Val Gln Leu Asn Ala Asp Asn Gln Phe Asn  
 465 470 475 480  
 Pro Asp Lys Leu Tyr Phe Gly Phe Arg Gly Gly Arg Leu Asp Leu Asn  
 485 490 495  
 Gly His Ser Leu Ser Phe His Arg Ile Gln Asn Thr Asp Glu Gly Ala  
 500 505 510  
 Met Ile Val Asn His Asn Gln Asp Lys Glu Ser Thr Val Thr Ile Thr  
 515 520 525  
 Gly Asn Lys Asp Ile Ala Thr Thr Gly Asn Asn Asn Ser Leu Asp Ser  
 530 535 540  
 Lys Lys Glu Ile Ala Tyr Asn Gly Trp Phe Gly Glu Lys Asp Thr Thr  
 545 550 555 560  
 Lys Thr Asn Gly Arg Leu Asn Leu Val Tyr Gln Pro Ala Ala Glu Asp  
 565 570 575  
 Arg Thr Leu Leu Leu Ser Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Asn Ile Thr  
 580 585 590



ES 2 615 362 T3

Gln Thr Asn Gly Lys Leu Phe Phe Ser Gly Arg Pro Thr Pro His Ala  
 595 600 605

Tyr Asn His Leu Asn Asp His Trp Ser Gln Lys Glu Gly Ile Pro Arg  
 610 615 620

Gly Glu Ile Val Trp Asp Asn Asp Trp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Ala  
 625 630 635 640

Glu Asn Phe Gln Ile Lys Gly Gly Gln Ala Val Val Ser Arg Asn Val  
 645 650 655

Ala Lys Val Lys Gly Asp Trp His Leu Ser Asn His Ala Gln Ala Val  
 660 665 670

Phe Gly Val Ala Pro His Gln Ser His Thr Ile Cys Thr Arg Ser Asp  
 675 680 685

Trp Thr Gly Leu Thr Asn Cys Val Glu Lys Thr Ile Thr Asp Asp Lys  
 690 695 700

Val Ile Ala Ser Leu Thr Lys Thr Asp Ile Ser Gly Asn Val Asp Leu  
 705 710 715 720

Ala Asp His Ala His Leu Asn Leu Thr Gly Leu Ala Thr Leu Asn Gly  
 725 730 735

Asn Leu Ser Ala Asn Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Val Ser His Asn Ala  
 740 745 750

Thr Gln Asn Gly Asn Leu Ser Leu Val Gly Asn Ala Gln Ala Thr Phe  
 755 760 765

Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gly Asn Thr Ser Ala Ser Gly Asn Ala Ser  
 770 775 780

Phe Asn Leu Ser Asp His Ala Val Gln Asn Gly Ser Leu Thr Leu Ser  
 785 790 795 800

Gly Asn Ala Lys Ala Asn Val Ser His Ser Ala Leu Asn Gly Asn Val  
 805 810 815

Ser Leu Ala Asp Lys Ala Val Phe His Phe Glu Ser Ser Arg Phe Thr  
 820 825 830

Gly Gln Ile Ser Gly Gly Lys Asp Thr Ala Leu His Leu Lys Asp Ser  
 835 840 845

Glu Trp Thr Leu Pro Ser Gly Thr Glu Leu Gly Asn Leu Asn Leu Asp  
 850 855 860

Asn Ala Thr Ile Thr Leu Asn Ser Ala Tyr Arg His Asp Ala Ala Gly  
 865 870 875 880

Ala Gln Thr Gly Ser Ala Thr Asp Ala Pro Arg Arg Arg Ser Arg Arg  
 885 890 895

Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ser Val Thr Pro Pro Thr Ser Val Glu Ser  
 900 905 910

Arg Phe

ES 2 615 362 T3

<210> 36  
 <211> 1136  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

5

<220>  
 <221> Derivado del dominio de App

<400> 36

10

```

Gly His Thr Tyr Phe Gly Ile Asn Tyr Gln Tyr Tyr Arg Asp Phe Ala
1          5          10          15

Glu Asn Lys Gly Lys Phe Ala Val Gly Ala Lys Asp Ile Glu Val Tyr
20          25          30

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

Ile Asp Phe Ser Val Val Ser Arg Asn Gly Val Ala Ala Leu Val Gly
50          55          60

Asp Gln Tyr Ile Val Ser Val Ala His Asn Gly Gly Tyr Asn Asn Val
65          70          75          80

Asp Phe Gly Ala Glu Gly Arg Asn Pro Asp Gln His Arg Phe Thr Tyr
85          90          95

Lys Ile Val Lys Arg Asn Asn Tyr Lys Ala Gly Thr Lys Gly His Pro
100         105         110

Tyr Gly Gly Asp Tyr His Met Pro Arg Leu His Lys Phe Val Thr Asp
115         120         125

Ala Glu Pro Val Glu Met Thr Ser Tyr Met Asp Gly Arg Lys Tyr Ile
130         135         140

Asp Gln Asn Asn Tyr Pro Asp Arg Val Arg Ile Gly Ala Gly Arg Gln
145         150         155         160

Tyr Trp Arg Ser Asp Glu Asp Glu Pro Asn Asn Arg Glu Ser Ser Tyr
165         170         175

His Ile Ala Ser Ala Tyr Ser Trp Leu Val Gly Gly Asn Thr Phe Ala
180         185         190

Gln Asn Gly Ser Gly Gly Gly Thr Val Asn Leu Gly Ser Glu Lys Ile
195         200         205

Lys His Ser Pro Tyr Gly Phe Leu Pro Thr Gly Gly Ser Phe Gly Asp
210         215         220

Ser Gly Ser Pro Met Phe Ile Tyr Asp Ala Gln Lys Gln Lys Trp Leu
225         230         235         240

Ile Asn Gly Val Leu Gln Thr Gly Asn Pro Tyr Ile Gly Lys Ser Asn
245         250         255

Gly Phe Gln Leu Val Arg Lys Asp Trp Phe Tyr Asp Glu Ile Phe Ala
260         265         270
    
```

ES 2 615 362 T3

Gly Asp Thr His Ser Val Phe Tyr Glu Pro Arg Gln Asn Gly Lys Tyr  
 275 280 285  
 Ser Phe Asn Asp Asp Asn Asn Gly Thr Gly Lys Ile Asn Ala Lys His  
 290 295 300  
 Glu His Asn Ser Leu Pro Asn Arg Leu Lys Thr Arg Thr Val Gln Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Asn Val Ser Leu Ser Glu Thr Ala Arg Glu Pro Val Tyr His Ala  
 325 330 335  
 Ala Gly Gly Val Asn Ser Tyr Arg Pro Arg Leu Asn Asn Gly Glu Asn  
 340 345 350  
 Ile Ser Phe Ile Asp Glu Gly Lys Gly Glu Leu Ile Leu Thr Ser Asn  
 355 360 365  
 Ile Asn Gln Gly Ala Gly Gly Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Phe Thr Val  
 370 375 380  
 Ser Pro Glu Asn Asn Glu Thr Trp Gln Gly Ala Gly Val His Ile Ser  
 385 390 395 400  
 Glu Asp Ser Thr Val Thr Trp Lys Val Asn Gly Val Ala Asn Asp Arg  
 405 410 415  
 Leu Ser Lys Ile Gly Lys Gly Thr Leu His Val Gln Ala Lys Gly Glu  
 420 425 430  
 Asn Gln Gly Ser Ile Ser Val Gly Asp Gly Thr Val Ile Leu Asp Gln  
 435 440 445  
 Gln Ala Asp Asp Lys Gly Lys Lys Gln Ala Phe Ser Glu Ile Gly Leu  
 450 455 460  
 Val Ser Gly Arg Gly Thr Val Gln Leu Asn Ala Asp Asn Gln Phe Asn  
 465 470 475 480  
 Pro Asp Lys Leu Tyr Phe Gly Phe Arg Gly Gly Arg Leu Asp Leu Asn  
 485 490 495  
 Gly His Ser Leu Ser Phe His Arg Ile Gln Asn Thr Asp Glu Gly Ala  
 500 505 510  
 Met Ile Val Asn His Asn Gln Asp Lys Glu Ser Thr Val Thr Ile Thr  
 515 520 525  
 Gly Asn Lys Asp Ile Ala Thr Thr Gly Asn Asn Asn Ser Leu Asp Ser  
 530 535 540  
 Lys Lys Glu Ile Ala Tyr Asn Gly Trp Phe Gly Glu Lys Asp Thr Thr  
 545 550 555 560  
 Lys Thr Asn Gly Arg Leu Asn Leu Val Tyr Gln Pro Ala Ala Glu Asp  
 565 570 575  
 Arg Thr Leu Leu Leu Ser Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Asn Ile Thr  
 580 585 590

ES 2 615 362 T3

Gln Thr Asn Gly Lys Leu Phe Phe Ser Gly Arg Pro Thr Pro His Ala  
595 600 605

Tyr Asn His Leu Asn Asp His Trp Ser Gln Lys Glu Gly Ile Pro Arg  
610 615 620

Gly Glu Ile Val Trp Asp Asn Asp Trp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Ala  
625 630 635 640

Glu Asn Phe Gln Ile Lys Gly Gly Gln Ala Val Val Ser Arg Asn Val  
645 650 655

Ala Lys Val Lys Gly Asp Trp His Leu Ser Asn His Ala Gln Ala Val  
660 665 670

Phe Gly Val Ala Pro His Gln Ser His Thr Ile Cys Thr Arg Ser Asp  
675 680 685

Trp Thr Gly Leu Thr Asn Cys Val Glu Lys Thr Ile Thr Asp Asp Lys  
690 695 700

Val Ile Ala Ser Leu Thr Lys Thr Asp Ile Ser Gly Asn Val Asp Leu  
705 710 715 720

Ala Asp His Ala His Leu Asn Leu Thr Gly Leu Ala Thr Leu Asn Gly  
725 730 735

Asn Leu Ser Ala Asn Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Val Ser His Asn Ala  
740 745 750

Thr Gln Asn Gly Asn Leu Ser Leu Val Gly Asn Ala Gln Ala Thr Phe  
755 760 765

Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gly Asn Thr Ser Ala Ser Gly Asn Ala Ser  
770 775 780

Phe Asn Leu Ser Asp His Ala Val Gln Asn Gly Ser Leu Thr Leu Ser  
785 790 795 800

Gly Asn Ala Lys Ala Asn Val Ser His Ser Ala Leu Asn Gly Asn Val  
805 810 815

Ser Leu Ala Asp Lys Ala Val Phe His Phe Glu Ser Ser Arg Phe Thr  
820 825 830

Gly Gln Ile Ser Gly Gly Lys Asp Thr Ala Leu His Leu Lys Asp Ser  
835 840 845

Glu Trp Thr Leu Pro Ser Gly Thr Glu Leu Gly Asn Leu Asn Leu Asp  
850 855 860

Asn Ala Thr Ile Thr Leu Asn Ser Ala Tyr Arg His Asp Ala Ala Gly  
865 870 875 880

Ala Gln Thr Gly Ser Ala Thr Asp Ala Pro Arg Arg Arg Ser Arg Arg  
885 890 895

Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ser Val Thr Pro Pro Thr Ser Val Glu Ser  
900 905 910

Arg Phe Asn Thr Leu Thr Val Asn Gly Lys Leu Asn Gly Gln Gly Thr



ES 2 615 362 T3

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

<210> 38  
 <211> 279  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

<220>  
 <221> Derivado del dominio de App

<400> 38

5

10

ES 2 615 362 T3

Asn Ser Gly Leu Ser Glu Phe Ser Ala Thr Leu Asn Ser Val Phe Ala  
1 5 10 15

Val Gln Asp Glu Leu Asp Arg Val Phe Ala Glu Asp Arg Arg Asn Ala  
20 25 30

Val Trp Thr Ser Gly Ile Arg Asp Thr Lys His Tyr Arg Ser Gln Asp  
35 40 45

Phe Arg Ala Tyr Arg Gln Gln Thr Asp Leu Arg Gln Ile Gly Met Gln  
50 55 60

Lys Asn Leu Gly Ser Gly Arg Val Gly Ile Leu Phe Ser His Asn Arg  
65 70 75 80

Thr Glu Asn Thr Phe Asp Asp Gly Ile Gly Asn Ser Ala Arg Leu Ala  
85 90 95

His Gly Ala Val Phe Gly Gln Tyr Gly Ile Asp Arg Phe Tyr Ile Gly  
100 105 110

Ile Ser Ala Gly Ala Gly Phe Ser Ser Gly Ser Leu Ser Asp Gly Ile  
115 120 125

Gly Gly Lys Ile Arg Arg Arg Val Leu His Tyr Gly Ile Gln Ala Arg  
130 135 140

Tyr Arg Ala Gly Phe Gly Gly Phe Gly Ile Glu Pro His Ile Gly Ala  
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Phe Val Gln Lys Ala Asp Tyr Arg Tyr Glu Asn Val Asn  
165 170 175

Ile Ala Thr Pro Gly Leu Ala Phe Asn Arg Tyr Arg Ala Gly Ile Lys  
180 185 190

Ala Asp Tyr Ser Phe Lys Pro Ala Gln His Ile Ser Ile Thr Pro Tyr  
195 200 205

Leu Ser Leu Ser Tyr Thr Asp Ala Ala Ser Gly Lys Val Arg Thr Arg  
210 215 220

Val Asn Thr Ala Val Leu Ala Gln Asp Phe Gly Lys Thr Arg Ser Ala  
225 230 235 240

Glu Trp Gly Val Asn Ala Glu Ile Lys Gly Phe Thr Leu Ser Leu His  
245 250 255

Ala Ala Ala Ala Lys Gly Pro Gln Leu Glu Ala Gln His Ser Ala Gly  
260 265 270

Ile Lys Leu Gly Tyr Arg Trp  
275

<210> 39  
<211> 501  
<212> PRT  
<213> *Neisseria meningitidis*

5

<220>

ES 2 615 362 T3

<221> Derivado del dominio de App

<400> 39

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

5



ES 2 615 362 T3

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



**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína que consiste en:
- (a) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o 5;
  - (b) una secuencia de aminoácidos que tiene sobre su longitud completa una identidad de secuencia de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 2;
  - (c) una secuencia de aminoácidos que tiene sobre su longitud completa una identidad de secuencia de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 5; o
  - (d) un fragmento de 200 o más aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o 5.
- que carece del péptido líder N terminal de SEQ ID NO: 2 o 5; y
- que carece del anclaje de la membrana C-terminal de SEQ ID NO: 2 o 5.
2. La proteína de la reivindicación 1, que incluye la secuencia de héptada de las SEQ ID NO: 2 o 5 (AA<sub>1</sub>AA<sub>2</sub>AA<sub>3</sub>AA<sub>4</sub>AA<sub>5</sub>AA<sub>6</sub>AA<sub>7</sub>)<sub>r</sub>, en la que: AA<sub>1</sub> es Leu, Ile, Val o Met; cada uno de AA<sub>2</sub> AA<sub>3</sub> AA<sub>4</sub> AA<sub>5</sub> AA<sub>6</sub> y AA<sub>7</sub> puede ser independientemente cualquier aminoácido; y *r* es un número entero de 1 o más.
3. Ácido nucleico que codifica una proteína de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
4. Una composición inmunogénica que comprende (a) la proteína de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 y /o (b) el ácido nucleico de la reivindicación 3.
5. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el ácido nucleico de la reivindicación 3 o la composición inmunogénica de la reivindicación 4, para su uso como medicamento.
6. La proteína de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, el ácido nucleico de la reivindicación 3 o la composición inmunogénica de la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por *Neisseria* en un mamífero.
7. El uso de la proteína de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, del ácido nucleico de la reivindicación 3, o de la composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por *Neisseria* en un mamífero.
8. La proteína, el ácido nucleico o la composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, o para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la infección por *Neisseria* es una infección por *N. meningitidis* de linajes hipervirulentos ET - 5, EY - 37 y el clúster A4.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un antígeno que, cuando se administra a un mamífero, provoca una respuesta inmunitaria que es protectora contra una cepa de linaje III de *N. meningitidis*.

FIGURA 1

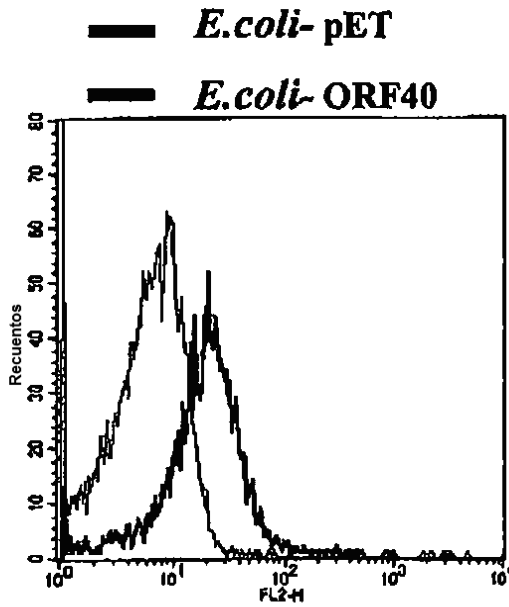
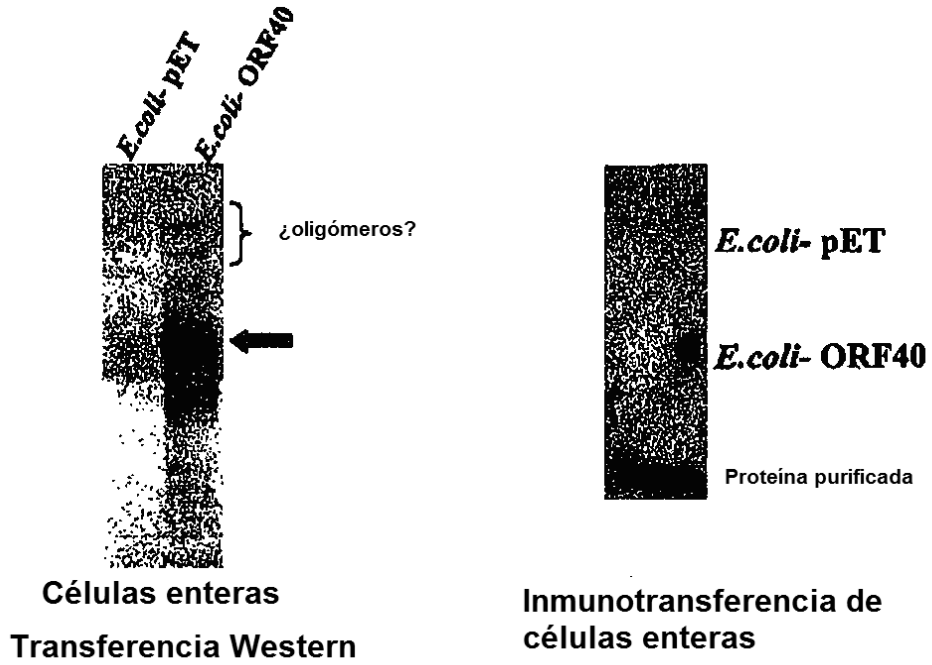


FIGURA 2

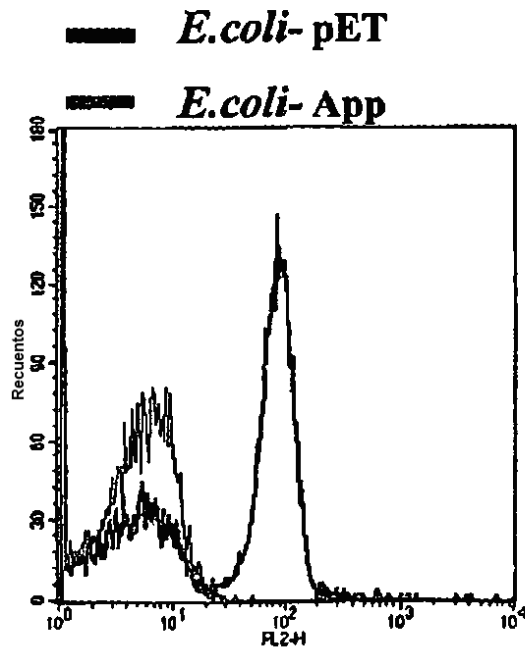
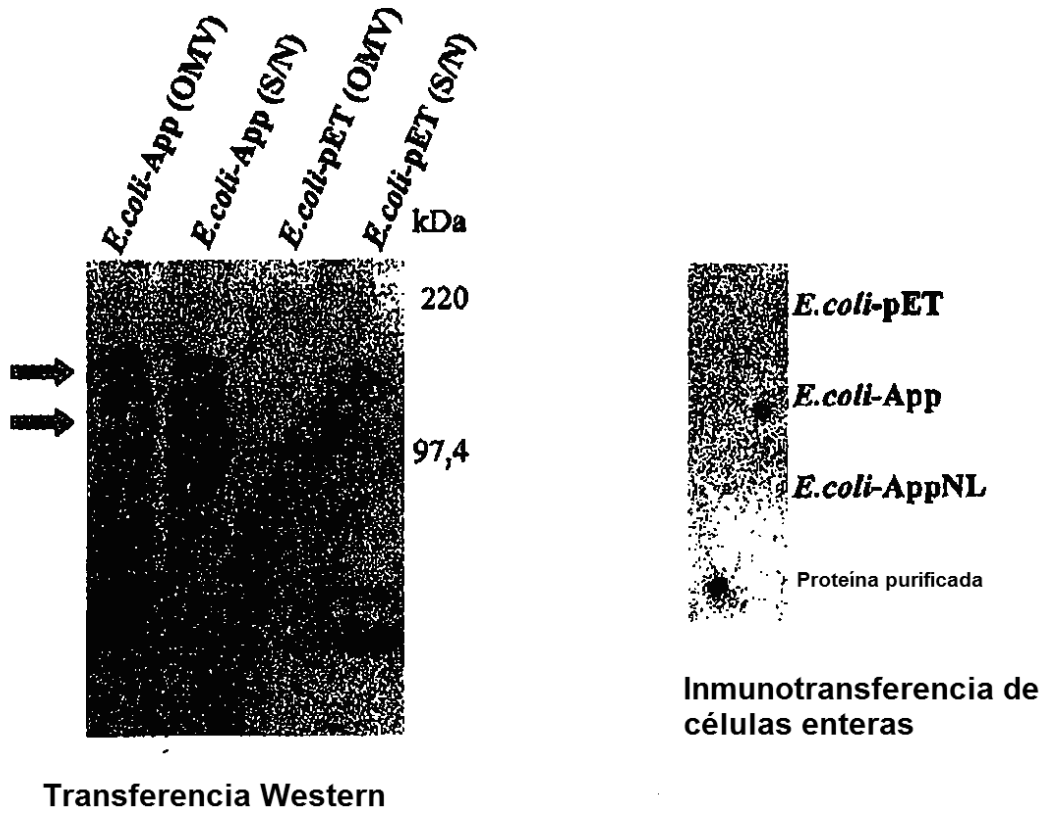
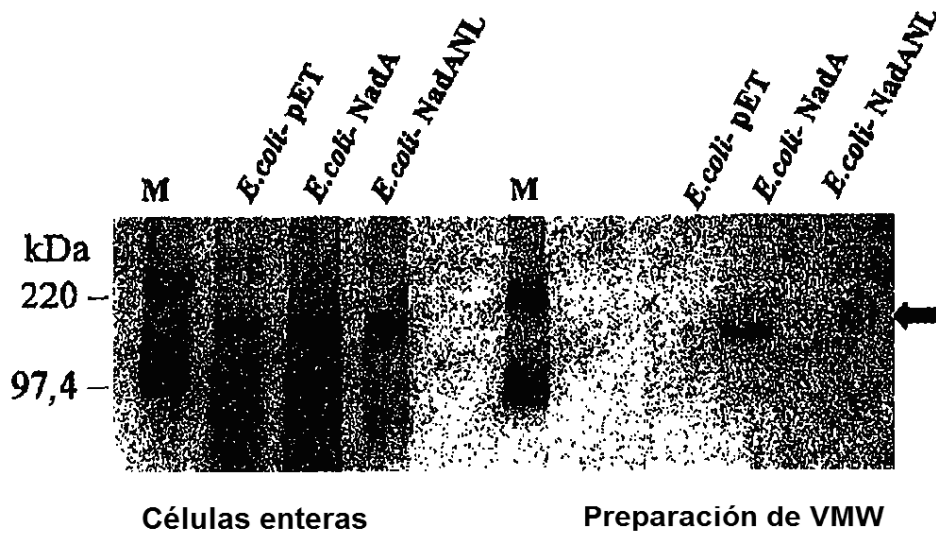
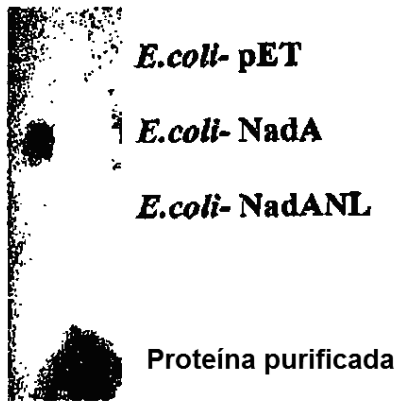


Figura 3



SDS-PAGE



Inmunotransferencia de células enteras

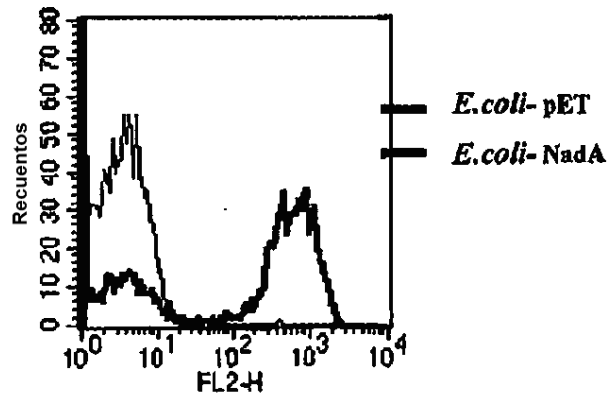


FIGURA 4

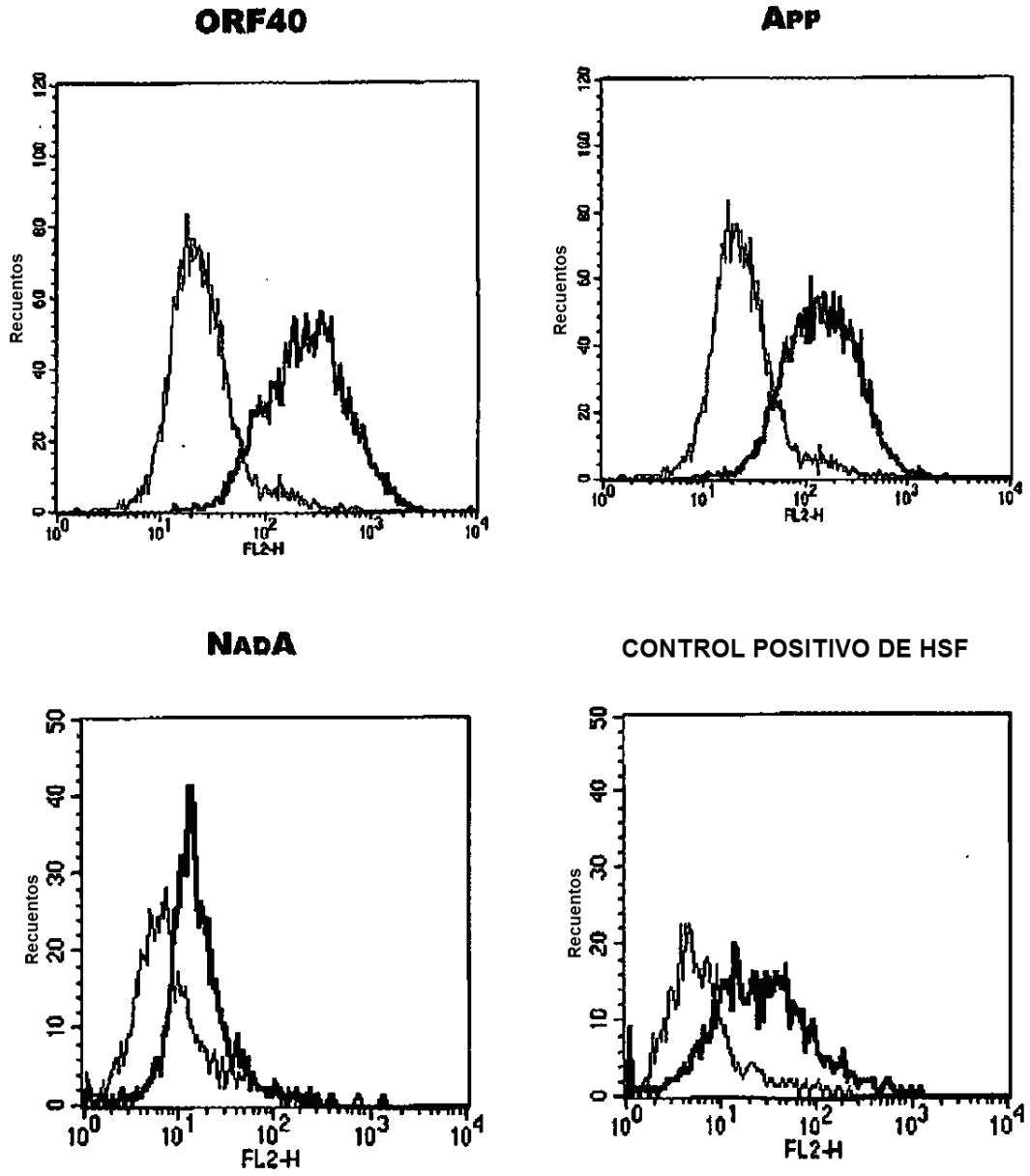
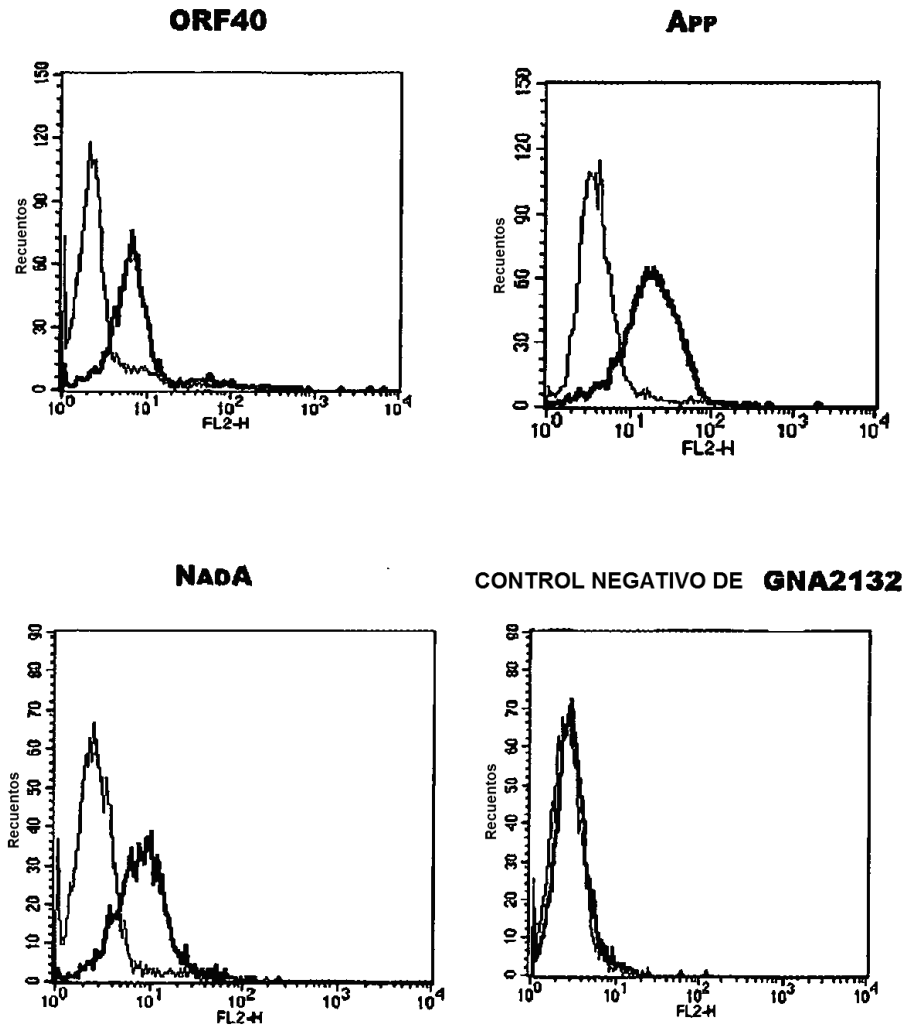
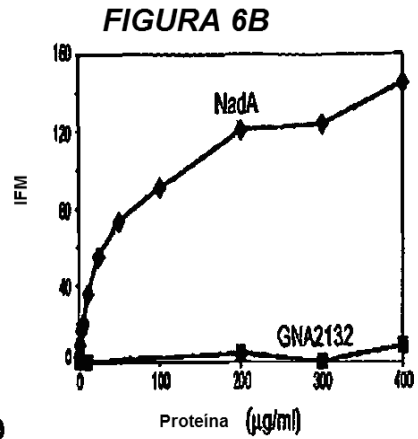
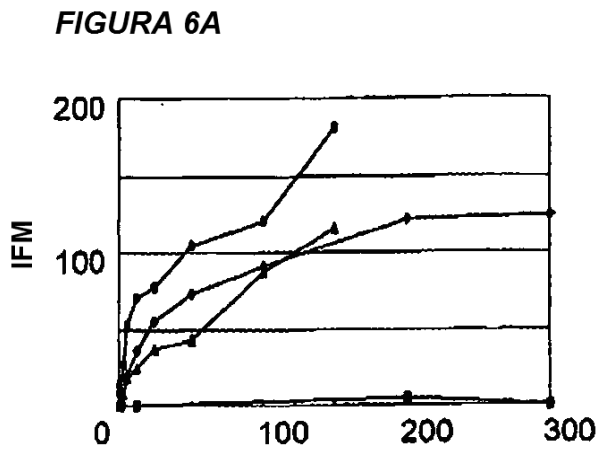


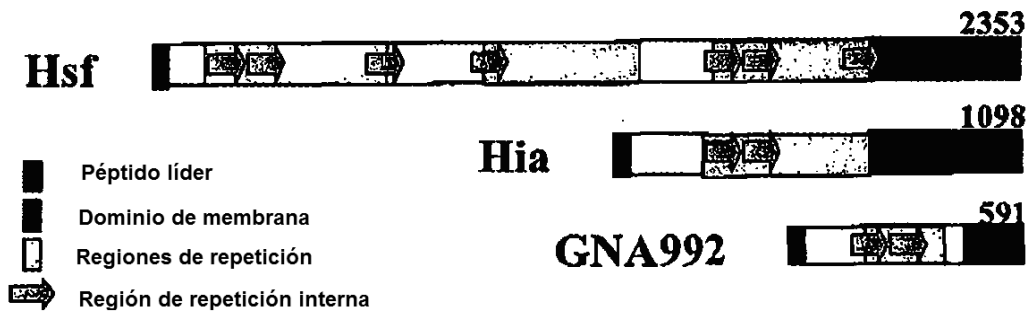
FIGURA 5







**FIGURA 7**



**FIGURA 8**

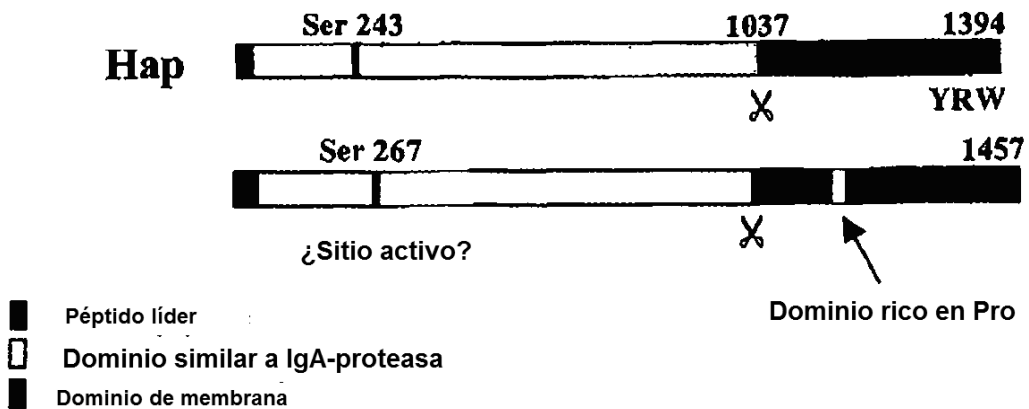


FIGURA 9A

ALELO 1 1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAAATVAIAAYNNGQEI: 50  
 ALELO 2 1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATNDDDVKKAAATVAIAAYNNGQEI: 50  
 ALELO 3 1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATNDDDVKKAAATVAIAAYNNGQEI: 50

ALELO 1 51:NGFKAGETIYDIEDGTITKDATAADVEADDFKGLGLKVVVNLTKTVN:100  
 ALELO 2 51:NGFKAGETIYDIDEDGTITKDATAADVEADDFKGLGLKVVVNLTKTVN:100  
 ALELO 3 51:NGFKAGETIYDIDEDGTITKDATAADVEADDFKGLGLKVVVNLTKTVN:100

ALELO 1 101:ENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGE:150  
 ALELO 2 101:ENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTK.....LADTDAALDATTNALNKLGE:143  
 ALELO 3 101:ENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGE:150

ALELO 1 151:NITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADE:200  
 ALELO 2 144:NITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADE:193  
 ALELO 3 151:NITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADE:200

ALELO 1 201:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEAV:250  
 ALELO 2 194:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEAV:243  
 ALELO 3 201:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEAV:250

ALELO 1 251:AAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKL:273  
 ALELO 2 244:AAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKL:293  
 ALELO 3 251:AAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKL:300

ALELO 1 273:.....RQSLDRLVSLRKETROGLAEQAALSGLFQYPN:307  
 ALELO 2 294:DTRLASAEKSIHGHGTRLNGLDRTVSDLRKETROGLAEQAALSGLFQYPN:343  
 ALELO 3 301:DTRLASAEKSIHGHGTRLNGLDRTVSDLRKETROGLAEQAALSGLFQYPN:350

ALELO 1 308:VGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYH:357  
 ALELO 2 344:VGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYH:393  
 ALELO 3 351:VGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYH:400

ALELO 1 358:VGVNYEW:364  
 ALELO 2 394:VGVNYEW:400  
 ALELO 3 401:VGVNYEW:407

FIGURA 9B

<----- lider ----->

ALELO\_3 MKHFP SKVLTTAILATFC SGALAA TNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQ EING 50  
 ALELO\_2 .....  
 ALELO\_1 ..... S ..... V .....

PKAGETIYDIDEDGTITTKDATAADVEADDFKGLQLKVVVTLTKTVNEN 100  
 ALELO 3  
 ALELO 2 .....  
 ALELO 1 ..... G ..... Q .....

----- segmento de hélice superenrollada ----->

ALELO\_3 KQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNAINKLGENI 150  
 ALELO\_2 .....  
 ALELO\_1 ..... E .....

-----<

ALELO 3 TTFAEETKTNIVKID EKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAD EAV 200  
 ALELO 2 .....  
 ALELO 1 .....

----- segmento de hélice superenrollada ----->

ALELO\_3 KTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEAVAA 250  
 ALELO\_2 .....  
 ALELO\_1 .....

----->

ALELO 3 KVTDIKADIATNKDNIARKANSADVTRRESQSKFVRIDGLEATTEKLD T 300  
 ALELO 2 .....  
 ALELO 1 ..... AD ..... [ ] .....

----->

ALELO\_3 RLSAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETROGLAEQAALSGLFQPYNVG 350  
 ALELO\_2 ..... TE . G ..... R .....  
 ALELO\_1 [ ] . IDS . . N . AN . .....

<----- anclaje de membrana ----->

ALELO 3 RFNVTAAVGGYKSES AVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVG 400  
 ALELO 2 .....  
 ALELO 1 .....

----->

ALELO\_3 VNYEW 405  
 ALELO\_2 .....  
 ALELO\_1 .....

FIGURA 9C

<----- LÍDER ----->

ALELO 2 1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEI: 50  
 ALELO 3 1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEI: 50  
 ALELO 1 1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIIVAAYNNGQEI: 50  
 ALELOC 1:MSMKHFPSKVLTAAILAAL.SG AMADNAPTADEIAKAA VN YNNTQ I: 49

<----->

ALELO 2 51:NGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVNLTKTVN:100  
 ALELO 3 51:NGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVNLTKTVN:100  
 ALELO 1 51:NGFKAGETIYDIDEDGTITQKDATAADVEADDFKGLGLKVVNLTKTVN:100  
 ALELOC 50:NGFTVG TIYDIK D.KITKK ATEADVEADDFKGLGLKEVV.....: 90

-----SEGMENTO DE HÉLICE SUPERENROLLADA -----

ALELO 2 101:ENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTK.....LADTDAALDATTNALNKLGE:143  
 ALELO 3 101:ENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGE:150  
 ALELO 1 101:ENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNALNKLGE:150  
 ALELOC 90:.....AQHDQSLADLTET EN ALVKT A:116

-> <----->

ALELO 2 144:NITTFEAETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAE:193  
 ALELO 3 151:NITTFEAETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAE:200  
 ALELO 1 151:NITTFEAETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAE:200  
 ALELOC 117:V NDI A VKANTAAIGENKAA ATKADK.....TELDK:150

-----SEGMENTO DE HÉLICE SUPERENROLLADA -----

ALELO 2 194:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEV:243  
 ALELO 3 201:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEV:250  
 ALELO 1 201:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEV:250  
 ALELOC 150:.....VS KVTENETAIGK...KAN A VYT.KAEVY:178

----->

ALELO 2 244:AAKVTDIK.ADIATNKDNIAKKANSA VYTREESDSKFVR D LNA TEK:292  
 ALELO 3 251:AAKVTDIK.ADIATNKDNIAKKANSA VYTREESDSKFVR D LNA TEK:299  
 ALELO 1 251:AAKVTDIK.ADIATNKA IAK..NSA.....:273  
 ALELOC 179:TKQE DN FVKI DGIGN NTTANGL .....TR A AEQ VAD:217

----->

ALELO 2 293:LDTRLASAESIT HGTRLNGLD TVSDLRKETROGLAEQAALSGLFQPY:342  
 ALELO 3 300:LDTRLASAESIA HDTRLNGLD TVSDLRKETROGLAEQAALSGLFQPY:349  
 ALELO 1 273:.....R SLD NV LRKETROGLAEQAALSGLFQPY:306  
 ALELOC 218:HGTRLASAESIT HGTRLNGLD TVSDLRKETROGLAEQAALSGLFQPY:267

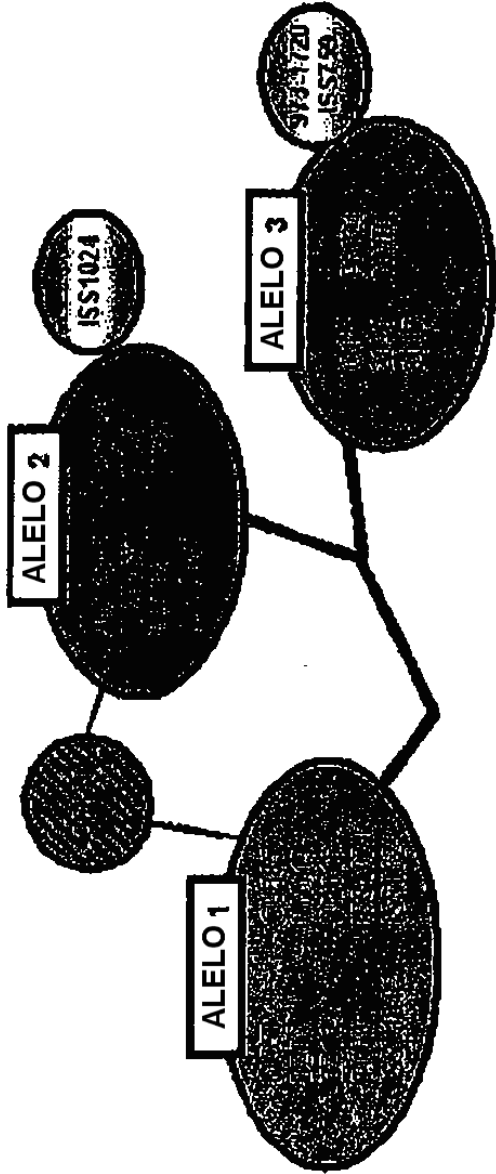
<----- ANCLAJE DE MEMBRANA ----->

ALELO 2 343:NVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAY:392  
 ALELO 3 350:NVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAY:399  
 ALELO 1 307:NVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAY:356  
 ALELOC 268:NVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAY:317

----->

ALELO 2 393:HVGVNYEW:400  
 ALELO 3 400:HVGVNYEW:407  
 ALELO 1 357:HVGVNYEW:364  
 ALELOC 318:HVGVNYEW:325

FIGURA 10



1 MSKGF P SKVL TTAIIA IF CSGALAAVSDDDVIGLAAVVAIVAAVYHQQE LDFEKA GETLYDI DEDETTIQKQATAADVWEADDFEEL GLKVVVYHL TKTVH  
 1 MSKGF P SKVL TTAIIA IF CSGALAAVSDDDVIGLAAVVAIVAAVYHQQE LDFEKA GETLYDI DEDETTIQKQATAADVWEADDFEEL GLKVVVYHL TKTVH  
 1 MSKGF P SKVL TTAIIA IF CSGALAAVSDDDVIGLAAVVAIVAAVYHQQE LDFEKA GETLYDI DEDETTIQKQATAADVWEADDFEEL GLKVVVYHL TKTVH  
 101 ENKQVVDKVKAAESEIEKL TTEIAD TDAALRD TBAALDEYTHAL EKL GENI TTPAEETHY IVKID EKL EAVAD TVDEKQDAFED IADSLDEYHYZADE  
 101 ENKQVVDKVKAAESEIEKL TTK -----LADTDAALDA TTHAL EKL GENI TTPAEETHY IVKID EKL EAVAD TVDEKQDAFED IADSLDEYHYZADE  
 101 ENKQVVDKVKAAESEIEKL TTEIAD TDAALRD TBAALDA TTHAL EKL GENI TTPAEETHY IVKID EKL EAVAD TVDEKQDAFED IADSLDEYHYZADE  
 201 AVKTA NEAKQTAEETKQVDAKVKQAAE VAAGSEZAAAGTANTAAD KA EAVAAKGTQ IKAAD IATKAD IAK ---ISA-----  
 194 AVKTA NEAKQTAEETKQVDAKVKQAAE VAAGSEZAAAGTANTAAD KA EAVAAKGTQ IKAAD IATKONTAKKASADY YTPRE SD SKFVR ID GL NAYTEKL  
 201 AVKTA NEAKQTAEETKQVDAKVKQAAE VAAGSEZAAAGTANTAAD KA EAVAAKGTQ IKAAD IATKONTAKKASADY YTPRE SD SKFVR ID GL NAYTEKL  
 ... RIDS LDKCVZALKEETRQ GLAEQAALSGLFQ PZAVVGGVNVTAAYV GYKSESAVALGTFPPE TEPFAKAGAVV GTSSGSSAAVH  
 294 DTRLSA EKSI TGHGTRLN GLDRVSDLEKETRQ GLAEQAALSGLFQ PZAVVGGVNVTAAYV GYKSESAVALGTFPPE TEPFAKAGAVV GTSSGSSAAVH  
 301 DTRLSA EKSIADND IRLN GLDKTVSDLEKETRQ GLAEQAALSGLFQ PZAVVGGVNVTAAYV GYKSESAVALGTFPPE TEPFAKAGAVV GTSSGSSAAVH  
 VGVNIEV  
 394 VGVNIEV  
 401 VGVNIEV



FIGURA 12A

ACCCATATCCTGACAAAAATTAAAGACACCGACACCGGACAGAAATTGACCATCAGCATAATATGTC  
 -36

ACATAATTAAACAGATATTAATGCCCGAAGTACCTAACTGCAAGAAT  
 -10

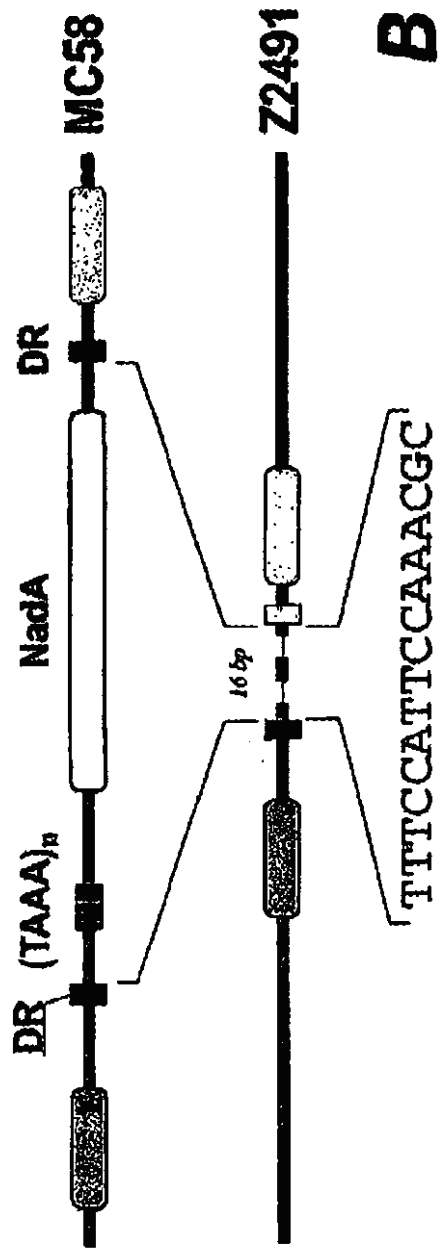
TTAAATTGGCACAATGTAATTGTATATATGCCCTCCTTTCATATATA

CTTTAATA TGTAACAACA ACTTGGTGGGRTAATAAATACTTACAAAGATTTCGGCCCCCATTT  
 -35 -10

TTTTATCCACTCACAAAGGTAATGAGCATG  
 -RBS

**A**

FIGURA 12B



**B**

FIGURA 13

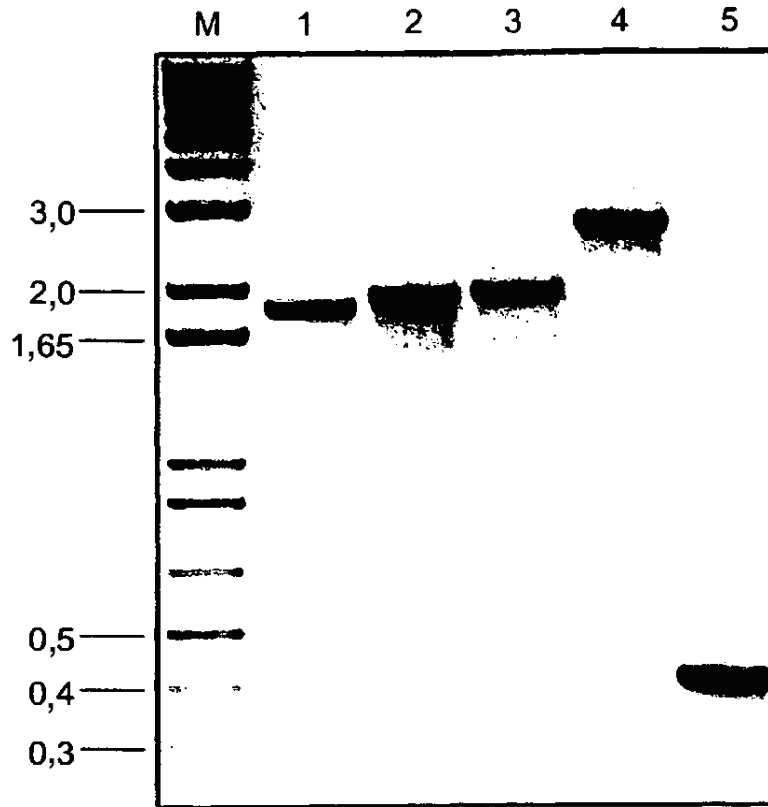


FIGURA 14

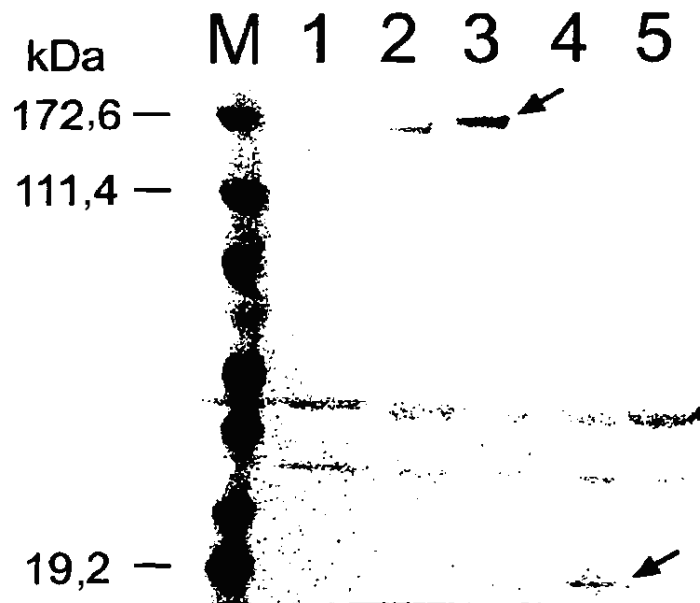




FIGURA 15A

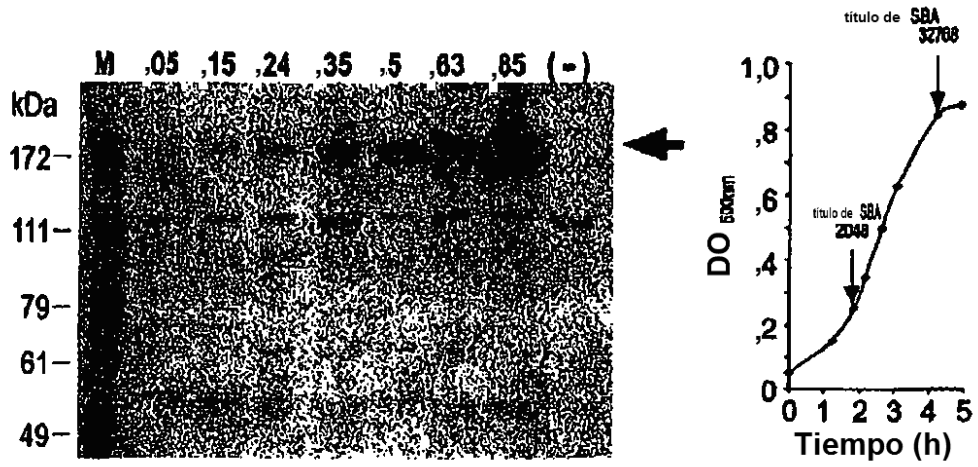


FIGURA 15B

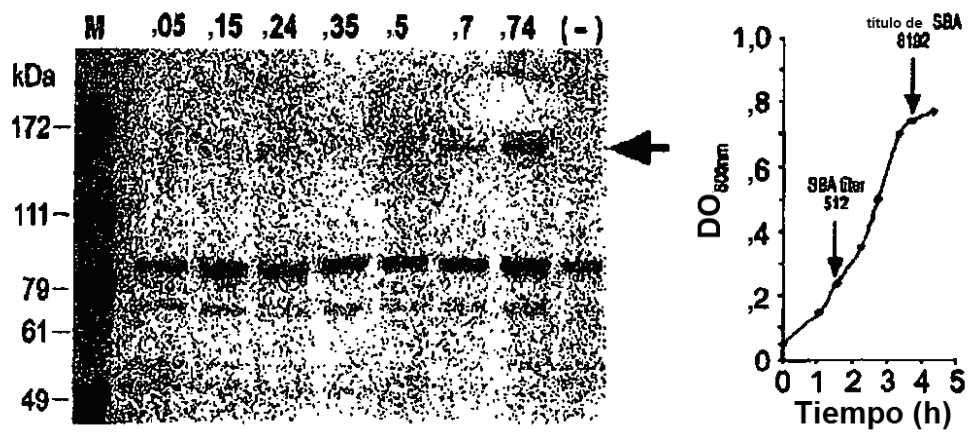
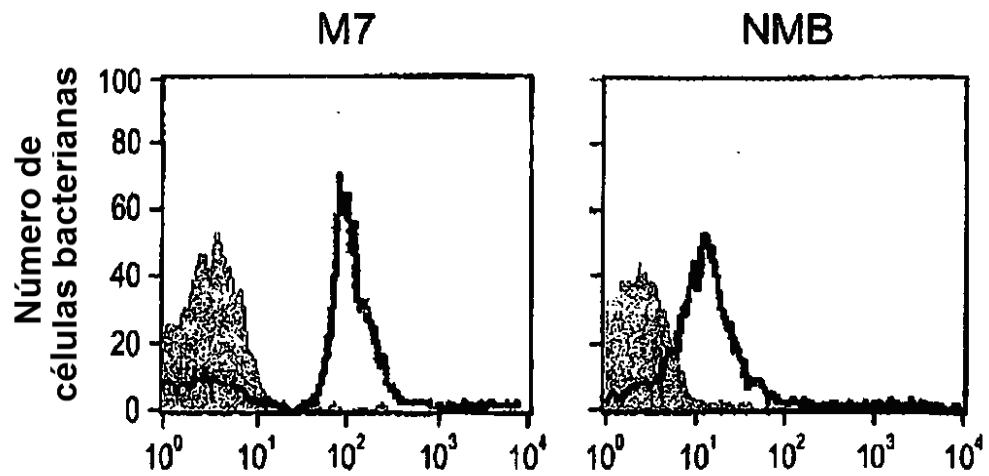
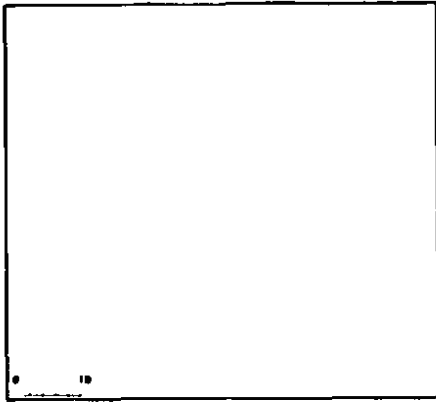


FIGURA 16

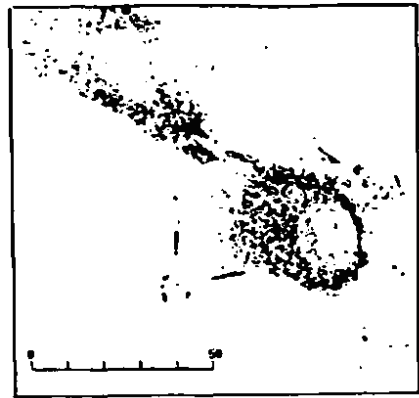


**FIGURA 17**

**FIGURA 17A**



**FIGURA 17B**



**FIGURA 17C**



**FIGURA 17D**

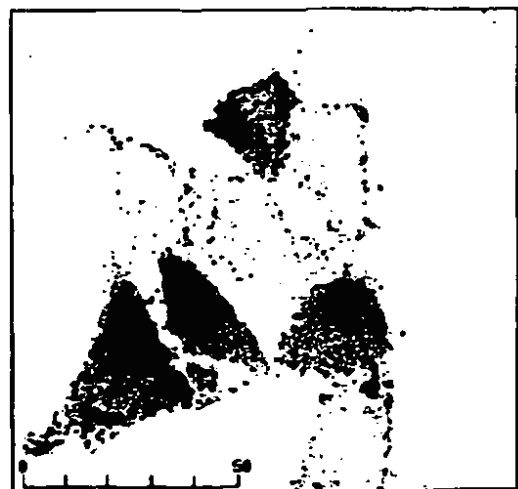


**FIGURA 18**

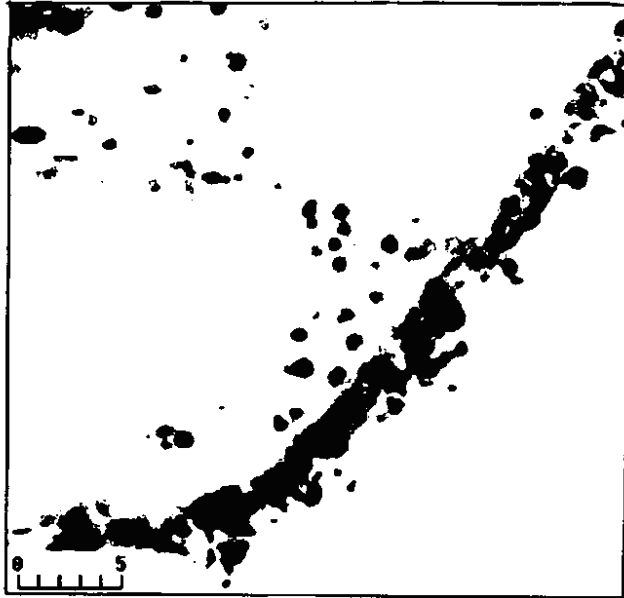
**FIGURA 18A**



**FIGURA 18B**

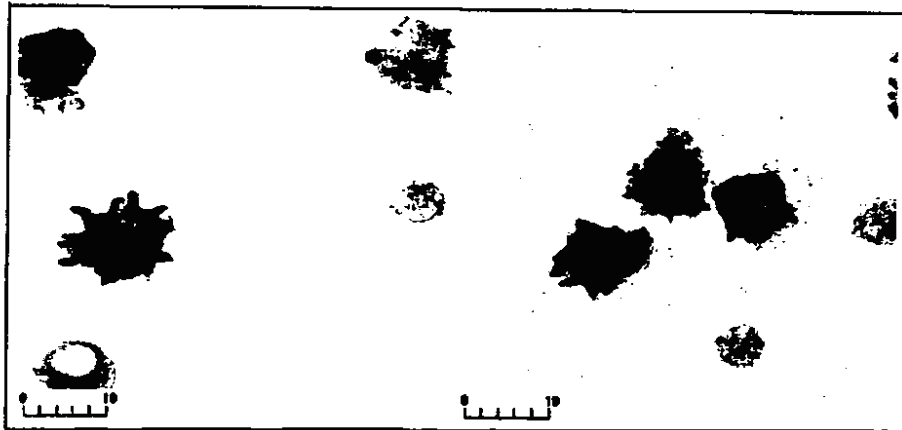


**FIGURA 19**



**FIGURA 20**

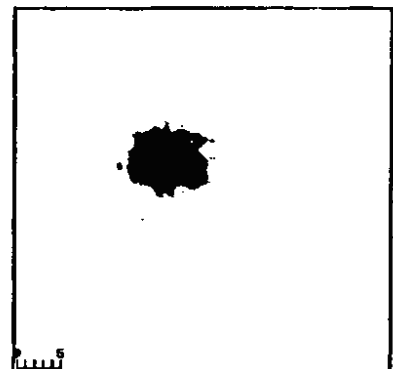
**FIGURA 20A**



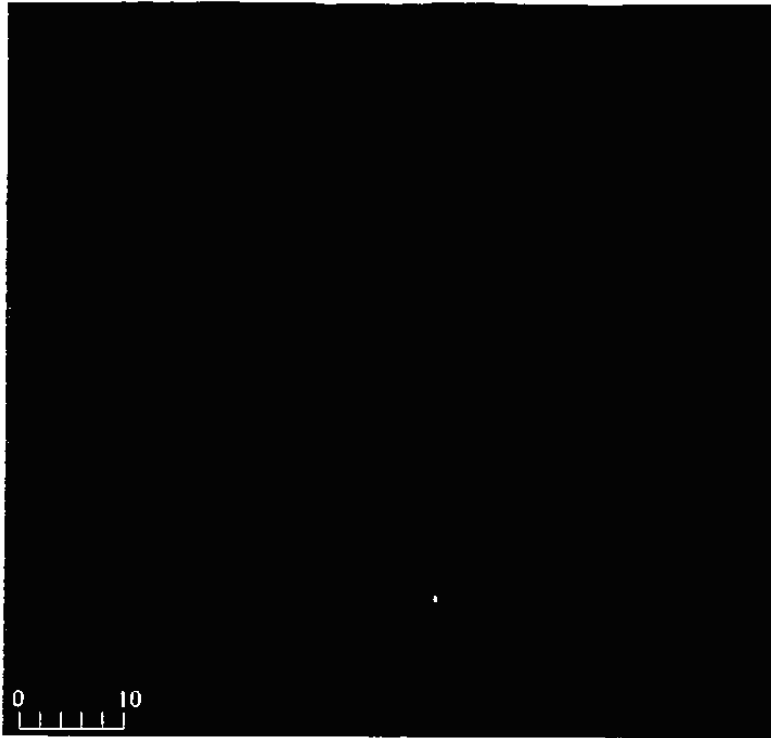
**FIGURA 20B**



**FIGURA 20C**



**FIGURA 21**



**FIGURA 22**

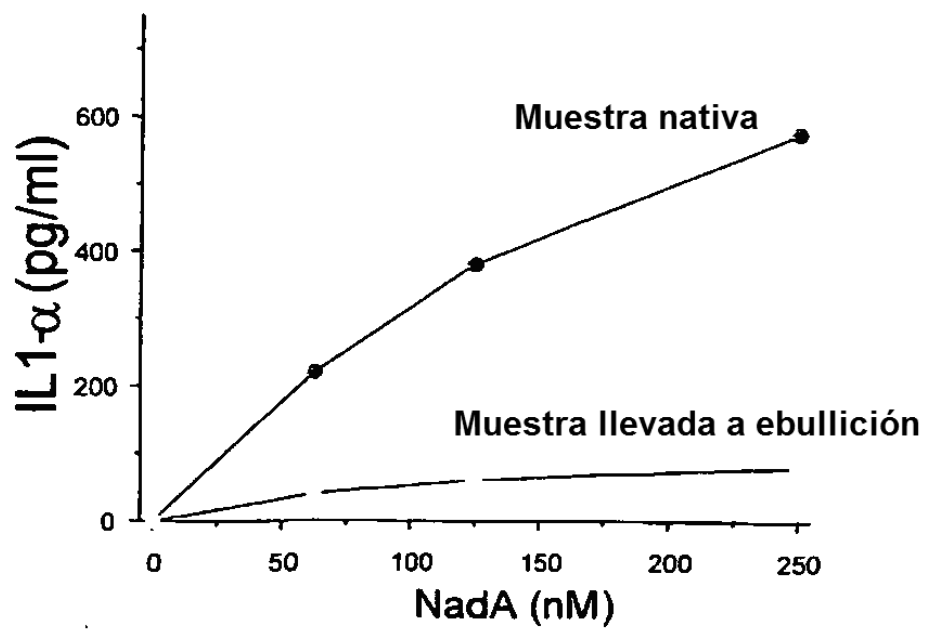


FIGURA 23

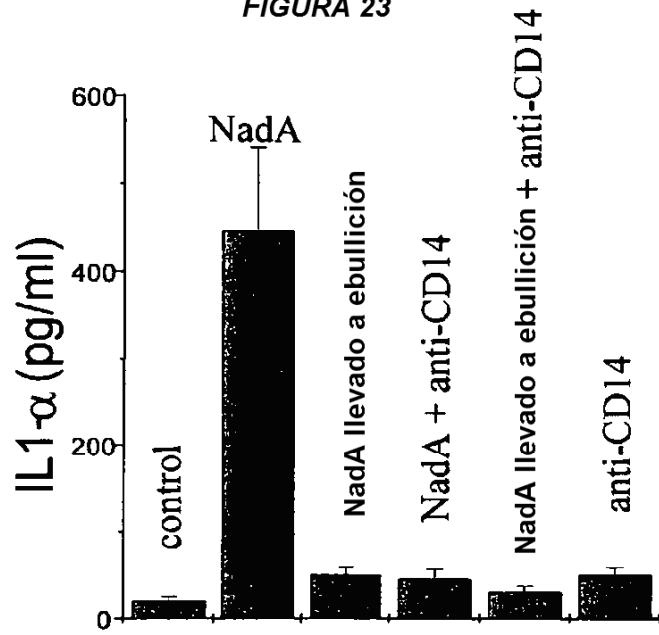


FIGURA 24

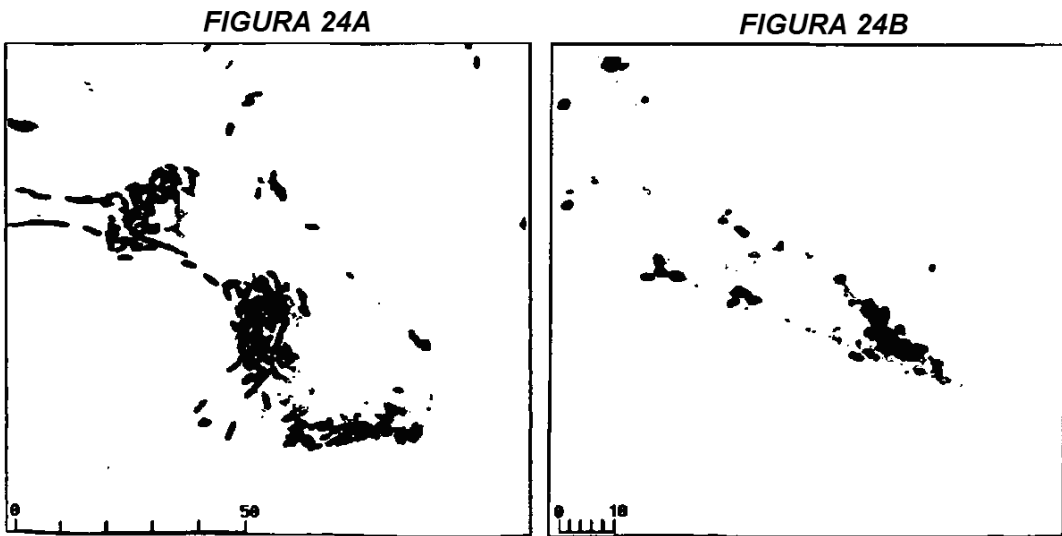


FIGURA 25

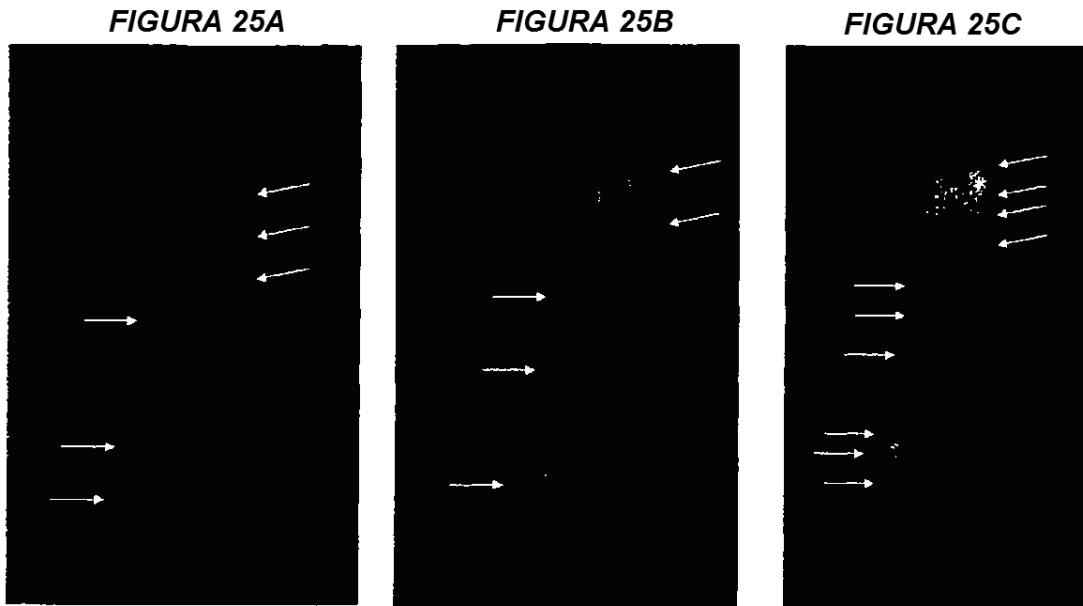
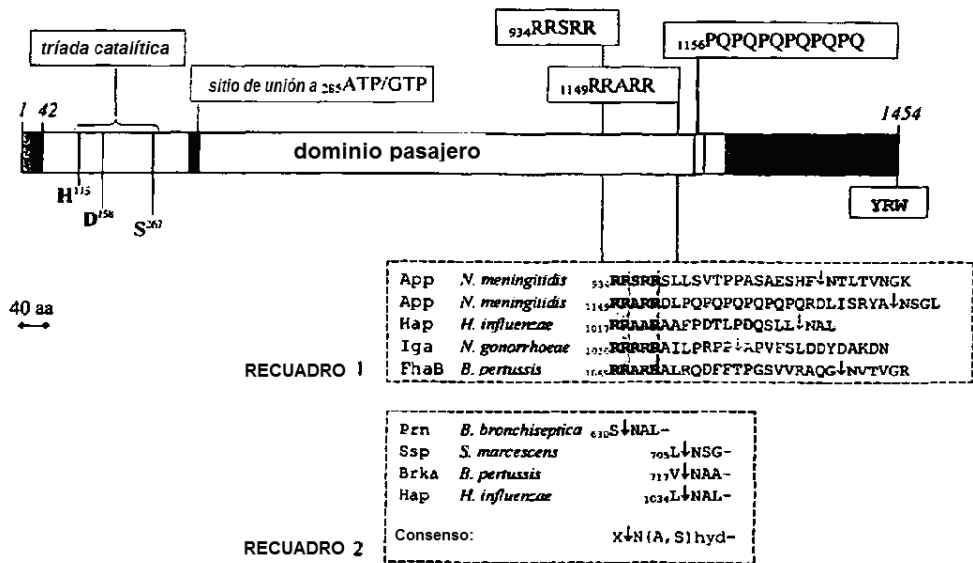
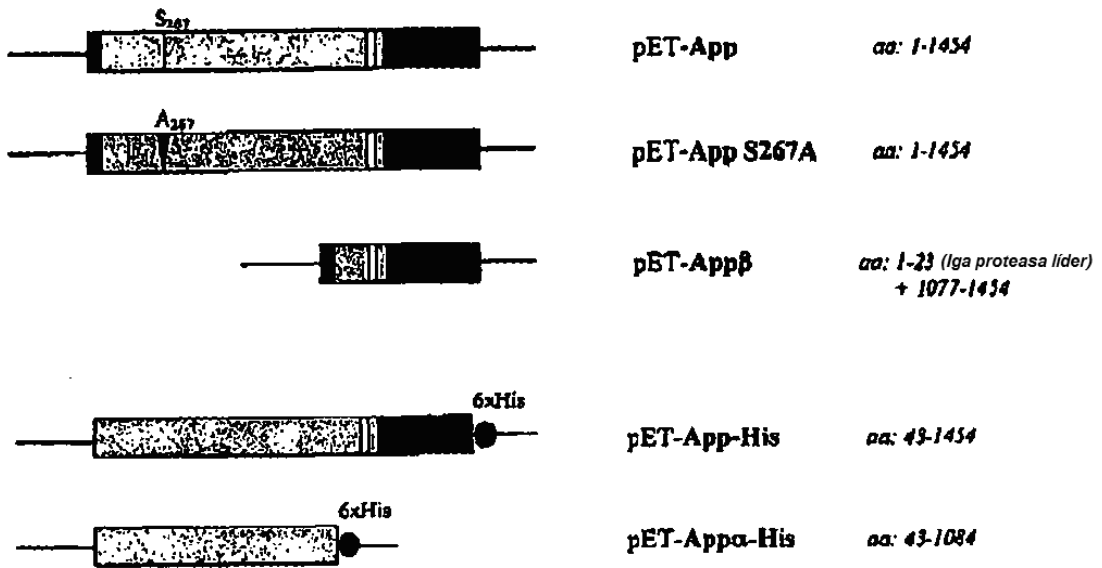


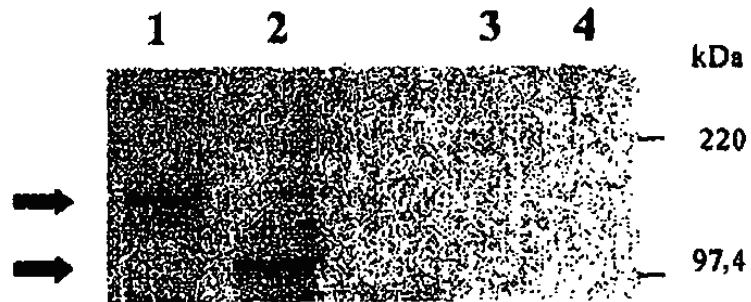
FIGURA 26



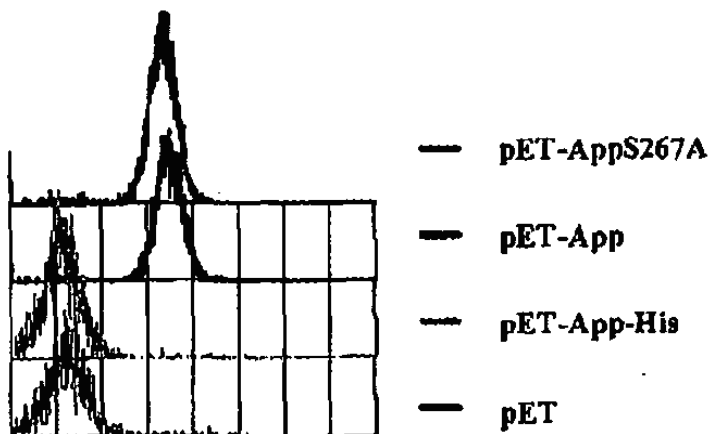
**FIGURA 27**



**FIGURA 28**



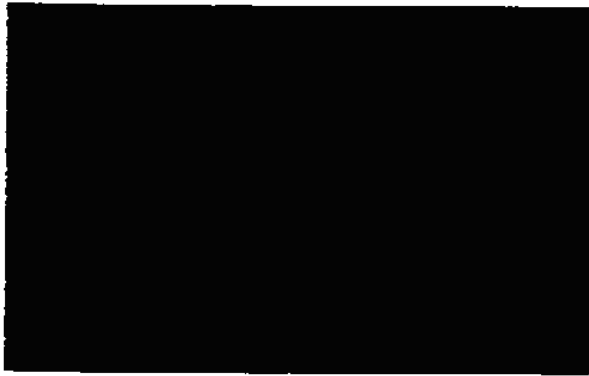
**FIGURA 29**



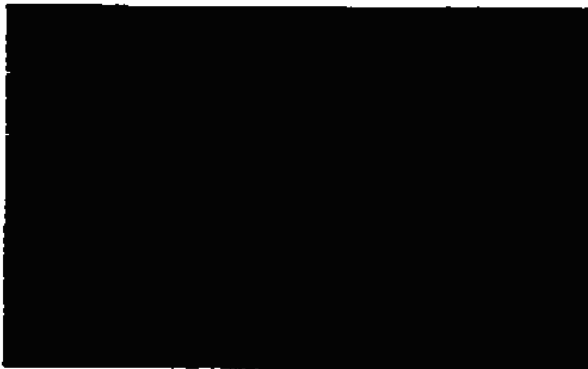
**FIGURA 30**



**pET-App**

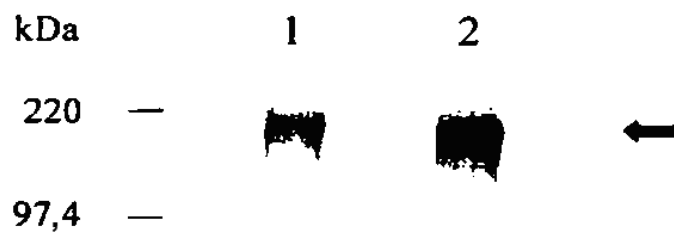


**pET-App-His**



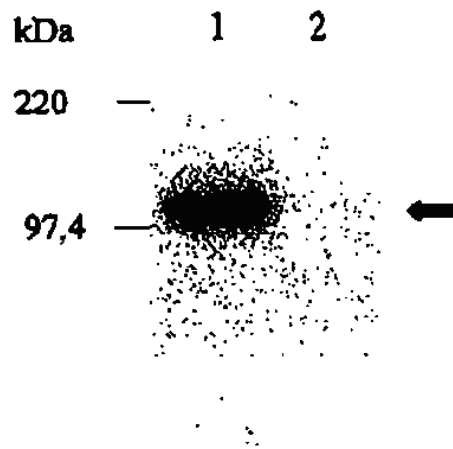
**pET**

**FIGURA 31**

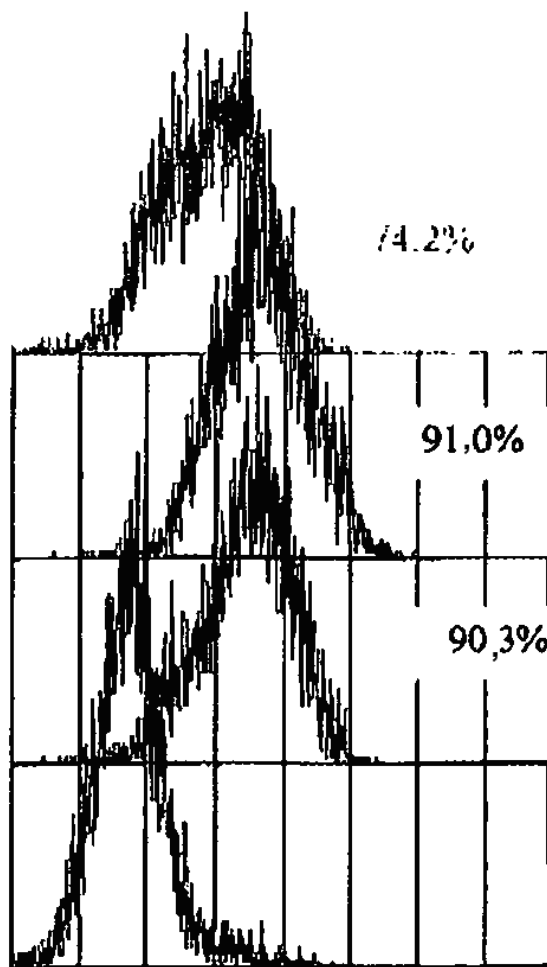




**FIGURA 32**

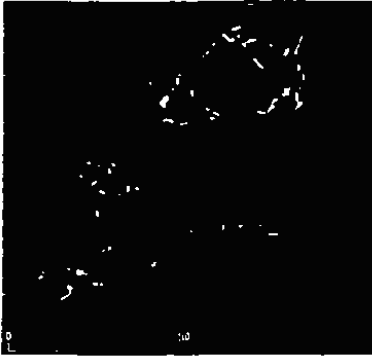


**FIGURA 33**

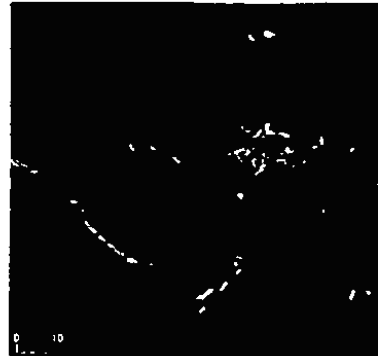


**FIGURA 34**

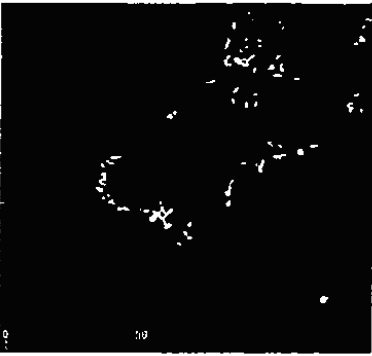
**FIGURA 34A**



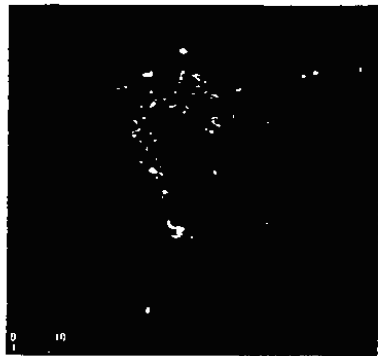
**FIGURA 34B**



**FIGURA 34C**



**FIGURA 34D**



**FIGURA 34E**



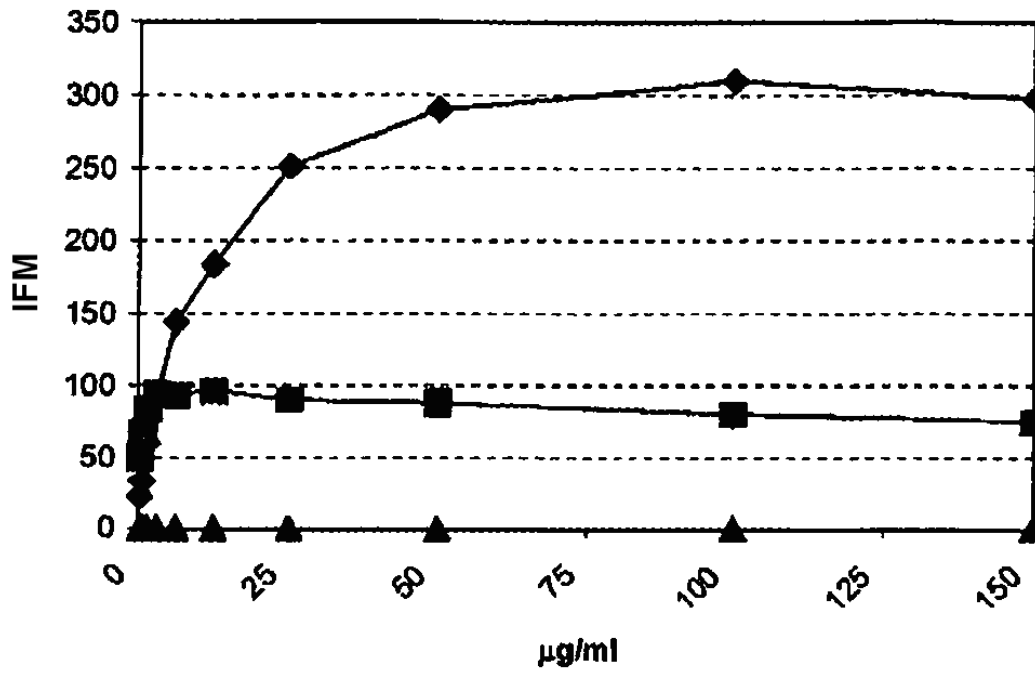
**FIGURA 34F**



**FIGURA 34G**



**FIGURA 35**



**FIGURA 36**

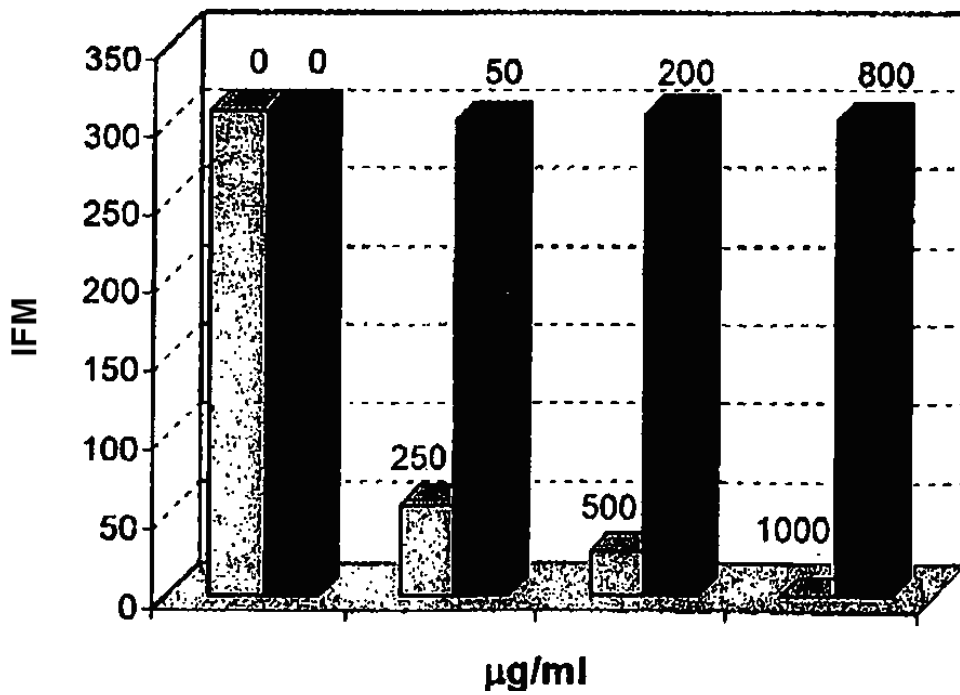


FIGURA 37

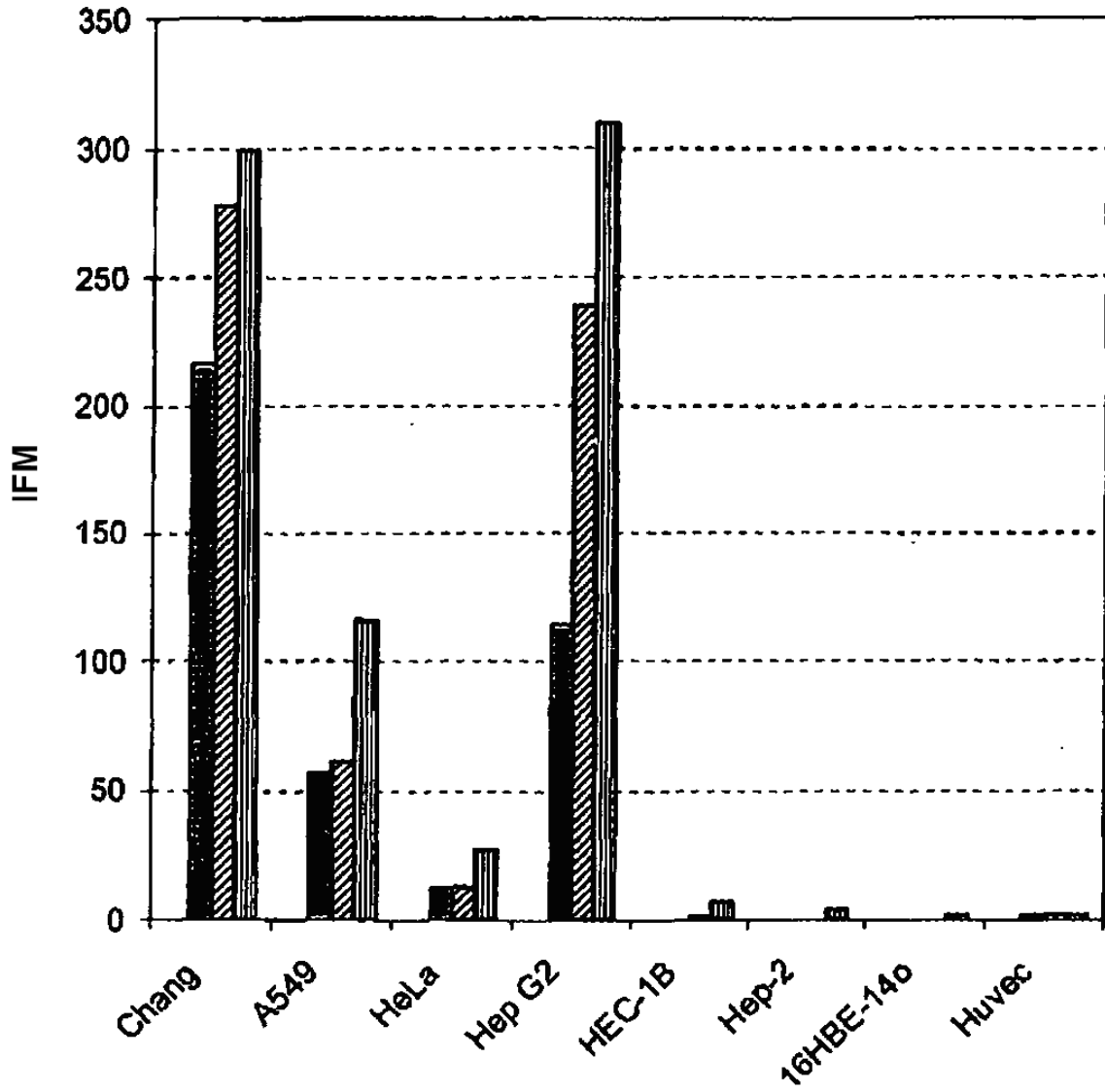


FIGURA 38

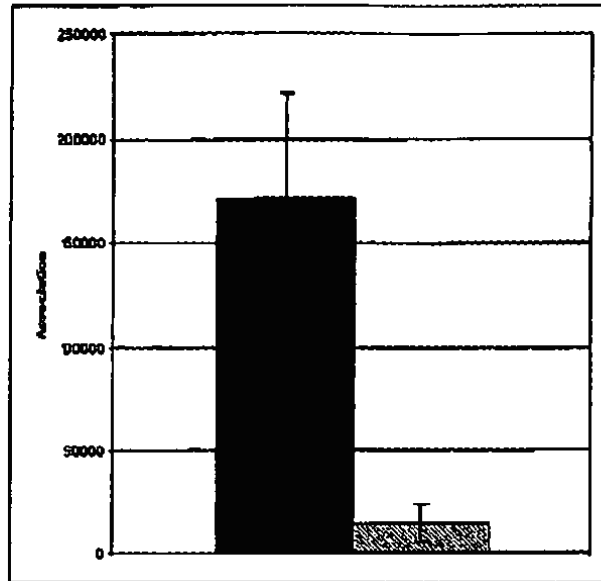


FIGURA 39

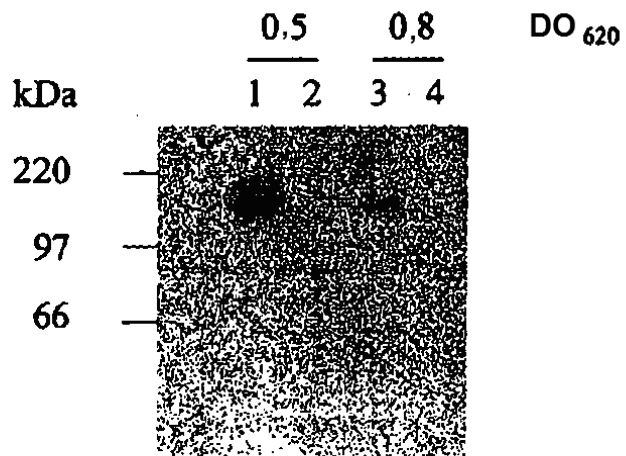


FIGURA 40

