

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 613**

51 Int. Cl.:

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2013 PCT/EP2013/052108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2013 E 13703562 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2809785**

54 Título: **Promotores para una expresión aumentada de proteínas en meningococos**

30 Prioridad:

02.02.2012 US 201261594159 P

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

14.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DELANY, ISABEL y
GUADAGNUOLO, SERAFINA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 654 613 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

Promotores para una expresión aumentada de proteínas en meningococos

Campo técnico

5 La presente invención pertenece al campo de los promotores para el control de la transcripción en bacterias meningocócicas.

Antecedentes de la técnica

10 *Neisseria meningitidis* es una causa de meningitis bacteriana. Un enfoque para la vacunación meningocócica se basa en vesículas de membrana externa (VME), como se usa en el producto MeNZB™ de Novartis y el producto MENBVAC™ del Instituto Noruego de Salud Pública, ambos de los cuales se generan mediante el tratamiento de meningococos con detergente.

15 Se sabe cómo cambiar la composición de proteínas de las membranas externas meningocócicas y, por tanto, cómo cambiar la composición de las VME. Se ha descrito tanto la inactivación de genes indeseables como la sobreexpresión de genes deseables. Las referencias 1-3 publican estudios preclínicos de una vacuna de VME en la que se sobreexpresa fHbp (también conocido como GNA1870) (y esta sobreexpresión puede combinarse con la inactivación de *LpxL1* [4]). La referencia 5 publicó un estudio clínico de cinco formulaciones de una vacuna de VME en la que *PorA* y *FrpB* se inactivan y *Hsf* y *TbpA* se sobreexpresan. La referencia 6 publica un estudio de fase I clínico de una vacuna de vesículas de membrana externa nativa preparada a partir de bacterias que tienen los genes *Synx* y *lpxL1* inactivados, fHbp sobreexpresada, dos proteínas *PorA* diferentes y la expresión estabilizada de *OpcA*. La referencia 7 publica una vacuna de vesículas de membrana externa trivalente nativa preparada a partir de bacterias que tienen los genes *Synx* y *lpxL1* inactivados (y, en dos casos, *IgtA* inactivado), dos proteínas *PorA* diferentes y *NadA* o fHbp sobreexpresadas. La inactivación de genes tales como *lpxL1* es importante si las vesículas se generarán por procedimientos que no eliminan el LPS.

20 Estos cambios en la composición de proteínas pueden efectuarse de diversas maneras. Por ejemplo, las bacterias pueden estar creciendo en condiciones limitantes de hierro con el fin estimular la expresión de ciertas proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. Otras técnicas pueden implicar la modificación por ingeniería genética de la bacteria. Por ejemplo, la referencia 8 indica que pueden usarse promotores fuertes (tales como los promotores *porA*, *porB*, *IGTF* o *hpuAB*) para regular positivamente la expresión de proteínas de membrana externa protectora o que pueden eliminarse mecanismos de control la transcripción supresora. La referencia 9 indica que los genes pueden modificarse por ingeniería genética para retirar su variabilidad de fase. El promotor *porA* se usó en la referencia 7 para sobreexpresar *NadA*, mientras que fHbp se sobreexpresó usando el promotor *tac*.

25 *Sawaya R y col. (Gene 11 de junio de 1999; 233 (1-2): 49-57)* realizaron un análisis mutacional de la región promotora del gen *porA* de *Neisseria meningitidis* y notificaron que se secuenciaron regiones promotoras de *porA* de diferentes aislados clínicos y se descubrió que difieren en el número de restos de guanosina en un rastro de poli(G) situado corriente arriba de la región -10.

30 Es un objeto de la invención proporcionar más y mejores formas de modificar la expresión de proteínas en meningococos y, en particular, proporcionar promotores para impulsar la expresión de genes de interés. Puede usarse regulación positiva para aumentar los niveles de proteínas útiles en VME.

Divulgación de la invención

35 Un primer aspecto de la invención usa promotores *porA* modificados para impulsar la transcripción. El promotor *porA* natural, como se usa en los Ejemplos 10-16 de la referencia 8, contiene una secuencia poli-G entre sus regiones -35 y -10, pero esta secuencia puede provocar la variación de fases y, por tanto, la expresión a partir del promotor *porA* natural puede ser inestable. Los promotores *porA* modificados de la invención están mejorados porque carecen de la secuencia de poli-G de tipo silvestre.

40 De este modo, de acuerdo con el primer aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende un promotor que tiene la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33 o la SEQ ID NO: 34.

El promotor de la invención incluye

45 (i) una región -10 de un promotor del gen *porA* meningocócico y
 (ii) una región -35 de un promotor del gen *porA* meningocócico,
 50 en el que la región -10 y la región -35 están separados por una secuencia intermedia (o espaciadora) de 16 o 17 nucleótidos, y en el que la secuencia intermedia incluye una secuencia de poli-guanidina que tiene no más de tres nucleótidos de guanidina consecutivos.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un vector de expresión bacteriano que comprende una secuencia de ADN que incluye un promotor de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden estar presentes en un *meningococo*. Por tanto, el tercer aspecto de la invención proporciona un *meningococo* que comprende una secuencia de ADN que incluye un promotor de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

5 Los promotores pueden impulsar la expresión de genes codificantes de proteínas corriente abajo (en particular, genes que codifican proteínas de membrana externa) a los que están unidos operativamente, y el *meningococo* pueden usarse para preparar vacunas (en particular vacunas a base de vesículas). Por tanto, en una realización preferida, el promotor impulsa la expresión de una proteína de membrana externa.

Promotores de la invención

10 Las dos secuencias esenciales en promotores bacterianos son la región -10 (también conocida como la caja de Pribnow) y la región -35. Éstas están separadas por una secuencia intermedia y entre la región -10 y el sitio de inicio de la transcripción (+1) hay una secuencia corta corriente arriba no transcrita.

15 El promotor *PorA* se ha estudiado en detalle. La referencia 10 notifica una región -35 de 6 monómeros, seguida de una secuencia intermedia de 16 o 17 monómeros, después, una caja de Pribnow de 6 monómeros, después, una secuencia corriente arriba no transcrita de 7 monómeros, seguida del nucleótido transcrito +1. El codón de inicio en el gen *porA* de tipo silvestre está en el nucleótido +59 del transcrito, y este espaciamiento de 59 monómeros se confirmó en la referencia 8.

Los promotores de acuerdo con la invención incluyen una región -10 de un promotor del gen *porA* meningocócico, ésta es un TATAAT de 6 monómeros, es decir, una región -10 de 6 monómeros típica.

20 Los promotores de acuerdo con la invención incluyen una región -35 de un promotor del gen *porA* meningocócico, ésta es un hexámero, ya sea TGGTTT o TTGACA.

La secuencia intermedia entre la región -35 y la región -10 puede ser de 16 o 17 nucleótidos. La secuencia corta corriente arriba no transcrita tiene 7 nucleótidos.

25 De este modo, un promotor de acuerdo con la invención incluye una región -35 de 6 monómeros, una secuencia intermedia de 16 monómeros o de 17 monómeros, una región -10 de 6 monómeros y una secuencia corriente arriba no transcrita de 7 monómeros, proporcionando 35 o 36 nucleótidos de promotor núcleo en total.

30 Un promotor puede, por supuesto, continuar corriente arriba de la región -35. Las secuencias corriente arriba de la región -35 pueden ser importantes para la expresión de alto nivel a partir del promotor, o para la regulación de la expresión de los promotores. Por ejemplo, en promotores de ARNr, las secuencias corriente arriba del promotor núcleo denominadas elementos UP pueden explicar su fuerza excepcional aumentando la transcripción tanto como 300 veces [11, 12]. Éstas pueden reconocerse por la subunidad α del núcleo de ARN polimerasa.

Los promotores de acuerdo con la invención contienen la secuencia corta corriente arriba no transcrita TGAAGAC.

La secuencia intermedia de los promotores de acuerdo con la invención puede ser ya sea TTTGCGAGGGAGGTGG (de 16 monómeros; SEQ ID NO: 27) o TTTTGCAGGGAGGTGG (de 17 monómeros; SEQ ID NO: 28).

35 En los promotores de acuerdo con la invención, la secuencia de poli-G dentro de la secuencia intermedia no tiene más de tres restos de guanidina consecutivos.

40 Cuando están presentes en forma de ADN funcional dentro de una bacteria, estos promotores se unen operativamente a una secuencia que codifica una proteína de interés, cuya transcripción está controlada por el promotor. La invención puede usarse para expresar cualquier proteína de interés, pero la proteína es preferentemente una proteína de membrana externa, preferentemente que pueda ser retenida en las vesículas. Se proporcionan a continuación proteínas de membrana externa preferidas. Idealmente, la invención no se usa para impulsar la expresión de un transcrito que codifique una proteína de membrana externa *PorA*.

En una secuencia de ADN codificante, corriente abajo de un promotor de la invención, el ADN incluye un sitio de inicio de la transcripción, seguido de una región no traducida 5' (normalmente que incluye una secuencia de Shine-Dalgarno) y después un codón de inicio para la proteína codificada de interés.

45 Se apreciará que los análisis de secuencias promotoras en el presente documento se refieren a la cadena codificante. En el ADN bicatenario, a partir del cual se produce la transcripción, el promotor tiene una cadena complementaria. Cuando se dice que dos elementos promotores están separados por 'n' nucleótidos, esto es de nuevo una referencia al número de nucleótidos en la cadena codificante; en el ADN bicatenario el elemento estará separado por 'n' pares de bases. Si se dice que un elemento promotor carece de un resto de guanidina, esto es de nuevo una referencia a la cadena codificante; en el ADN codificante, por ejemplo, un promotor sin guanidina podría incluir un resto de guanidina, pero solamente como una base complementaria en la cadena no codificante para un resto de citosina en la cadena codificante. Aunque la invención se describe por referencia a la cadena codificante, el ámbito de la invención incluye ácidos nucleicos bicatenarios que incluyen dichas cadenas codificantes, así como ácidos nucleicos monocatenarios que incluyen dichas cadenas codificantes o que incluyen formas no codificantes de

estas cadenas codificantes (estas cadenas no codificantes pueden, por supuesto, usarse para preparar las cadenas codificantes, mediante técnicas convencionales).

Vesículas

5 Los promotores PorA modificados de la invención son particularmente útiles en la preparación de vesículas meningocócicas, es decir, cualquier vesícula proteoliposómica obtenida mediante la disgregación o la vesiculación de una membrana externa meningocócica para formar vesículas de la misma que conserven antígenos de la membrana externa. De este modo, el término incluye, por ejemplo, las VME (a veces denominadas 'ampollas'), microvesículas (MV [13]) y 'VME nativas' ('VMEN' [14]).

10 Las MV y las VMEN son vesículas de membrana de origen natural que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y se liberan en el medio de cultivo. Las MV pueden obtenerse mediante el cultivo de *Neisseria* en un medio de cultivo de caldo, la separación de las células enteras de las MV más pequeñas en el medio de cultivo de caldo (por ejemplo, por filtración o por centrifugación a baja velocidad para sedimentar solamente las células y no las vesículas más pequeñas) y después la recogida de las MV del medio agotado de células (por ejemplo, mediante filtración, mediante precipitación diferencial o agregación de las MV, por
15 centrifugación a alta velocidad para sedimentar las MV). Las cepas para su uso en la producción de MV pueden seleccionarse generalmente basándose en la cantidad de MV producidas en cultivo, por ejemplo, las referencias 15 y 16 describen *Neisseria* con una elevada producción de MV.

20 Otra técnica útil para la producción espontánea de vesículas de membrana externa es inactivar el gen *MltA* en un meningococo, como se desvela en la referencia 17. Estas bacterias mutantes liberan vesículas en su medio de cultivo durante el crecimiento.

Se preparan VME artificialmente a partir de bacterias y pueden prepararse usando el tratamiento con detergente (por ejemplo, con desoxicolato) o por medios no detergentes (por ejemplo, véase la referencia 18). Las técnicas para formar VME incluyen el tratamiento de bacterias con un detergente de sal de ácido biliar (por ejemplo, sales de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc.,
25 prefiriéndose el desoxicolato de sodio [19 y 20] para el tratamiento de *Neisseria*) a un pH suficientemente alto como para no precipitar el detergente [21]. Pueden realizarse otras técnicas sustancialmente en ausencia de detergente [18] usando técnicas tales como tratamiento con ultrasonidos, homogeneización, microfluidificación, cavitación, choque osmótico, trituración, prensa francesa, mezcla, etc. Los procedimientos que usan poco o nada de detergente pueden conservar antígenos útiles, tales como NspA [18]. De este modo, un procedimiento puede usar un tampón de extracción de VME con aproximadamente un 0,5 % de desoxicolato o menos, por ejemplo, aproximadamente el
30 0,2 %, aproximadamente el 0,1 %, <0,05 % o cero. Un procedimiento útil para la preparación de VME se describe en la referencia 22 e implica la ultrafiltración de las VME en bruto, en lugar de la centrifugación a alta velocidad. El procedimiento puede implicar una etapa de ultracentrifugación después de que se realice la ultrafiltración.

Una manera conveniente de purificar vesículas es el procedimiento de filtración dual desvelado en la referencia 23.

35 Idealmente, las vesículas son aquellas que se forman espontáneamente durante el cultivo bacteriano, en lugar de aquellas que se liberan solo después de un tratamiento físico o químico de las bacterias. El crecimiento de meningococos que tiene un *MltA* inactivado es una manera adecuada de producir vesículas de esta manera. La referencia 46 desvela otras maneras de producir cepas con hipervesiculación. Para las vesículas liberadas espontáneamente es útil el uso de bacterias que no produzcan LOS intacto (las vesículas extraídas por detergente tienen niveles reducidos de LOS potencialmente reactógeno).
40

Si hay lipooligosacárido (LOS) presente en una vesícula, es posible tratar la vesícula con el fin de unir sus componentes de LOS y proteína (conjugación "intraampolla" [47]).

45 Las vesículas pueden carecer de LOS totalmente o pueden carecer de LOS hexaacilado, por ejemplo, el LOS en las vesículas puede tener un número reducido de cadenas acilo secundarias por molécula de LOS [24]. Por ejemplo, las vesículas pueden ser de una cepa que tiene una delección o mutación de *lpxL1* que da como resultado la producción de un LOS pentaacilado [2, 42]. El LOS en una cepa puede carecer de un epítipo de lacto-N-neotetraosa, por ejemplo, puede ser una cepa con inactivación de *Ist* y/o *IgtB* [5]. El LOS puede carecer de al menos un ácido graso unido a O primario de tipo silvestre [25]. El LOS puede no tener cadena α . El LOS puede comprender GlcNAc-Hep2fosfoetanolamina-KDO₂-Lípido A [26].

50 Las vesículas pueden incluir uno, más de uno o (idealmente) cero serosubtipos PorA. Se conoce la modificación de meningococos para proporcionar VME multi-PorA, por ejemplo, a partir de la referencia 27, que desvela la construcción de vesículas a partir de cepas modificadas para expresar seis subtipos de PorA diferentes y a partir de la referencia 28. Por el contrario, también se conoce la modificación para eliminar PorA, por ejemplo, a partir de la referencia 5.

55 Las vesículas pueden estar libres de uno de los dos PorA y FrpB. Las vesículas preferidas están libres de PorA.

Las vesículas pueden carecer de sacárido capsular. Por ejemplo, pueden derivar de una cepa que tiene uno o más

de los genes para la biosíntesis y/o la exportación de la cápsula desactivados (por ejemplo, *Synx*).

5 Pueden usarse mezclas de vesículas de diferentes cepas. Por ejemplo, la referencia 29 desvela una vacuna que comprende composiciones vesiculares meningocócicas multivalentes, que comprende una primera vesícula derivada de una cepa meningocócica con un serosubtipo prevalente en un país de uso y una segunda vesícula derivada de una cepa que no necesita tener un serosubtipo prevalente en un país de uso. La referencia 30 también desvela combinaciones útiles de diferentes vesículas. Puede usarse una combinación de vesículas de cepas en cada uno de los inmunitipos L2 y L3.

Sobreexpresión

10 Pueden usarse promotores de la invención para sobreexpresar un gen de interés en meningococos. Cuando el gen codifica un antígeno de proteína de membrana externa, esta sobreexpresión puede usarse para proporcionar una vesícula que conserva ventajosamente ese antígeno. Dichas vesículas se analizan con más detalle a continuación. Como resultado de la sobreexpresión, las vesículas preparadas a partir del meningococo modificado contienen niveles más altos del antígeno o antígenos sobreexpresados que los que se ven en un meningococo de tipo silvestre. El aumento de la expresión en las vesículas de forma útil es de al menos el 10 %, medido en masa del antígeno relevante por unidad de masa de vesículas y es de forma más útil de al menos el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 15 50 %, el 75 %, el 100 % o más.

Las modificaciones recombinantes adecuadas que pueden usarse para sobreexpresar un antígeno mediante el uso de promotores de la invención incluyen, pero no se limitan a: (i) sustitución del promotor; (ii) adición de genes; y/o (iii) reemplazo de genes. Estas tres técnicas, si se desea, pueden usarse en conjunto con (iv) inactivación del represor.

20 En el reemplazo del promotor, el promotor que controla la expresión del gen del antígeno en una bacteria se reemplaza por un promotor de la invención con el fin de proporcionar niveles de expresión más elevados.

25 En la adición de genes, una bacteria que ya expresa el antígeno recibe una segunda copia del gen pertinente. Esta segunda copia puede integrarse en el cromosoma bacteriano o puede estar en un elemento episómico tal como un plásmido. La segunda copia puede expresarse usando un promotor de la invención. El efecto de la adición de genes es aumentar la cantidad de antígeno expresado. Cuando se usa un plásmido, es idealmente un plásmido con un número de copias alto, por ejemplo, por encima de 10 o incluso por encima de 100.

30 En el reemplazo de genes, la adición de genes se produce, pero va acompañada de la delección de la copia existente del gen. Por ejemplo, este enfoque se usó en la referencia 3, donde se suprimió el gen *fHbp* cromosómico endógeno de una bacteria y se reemplazó por una copia codificada por plásmidos (véase también la referencia 31). La expresión de la copia de sustitución, usando un promotor de la invención, es mayor que la de la copia anterior, lo que conduce a la sobreexpresión.

35 En algunos casos se produce el reemplazo de genes cuando la adición de genes va acompañada de la delección de otro gen. Por ejemplo, cuando se requiere la inactivación de un gen endógeno, pero no es el gen de interés que está siendo sobreexpresado por el promotor de la invención.

En algunos casos, puede producirse más de un evento de adición de genes o de sustitución de genes, de manera que pueden producirse la expresión de múltiples copias del gen de interés por los promotores de la invención o combinaciones de sobreexpresión de diferentes genes de interés por los promotores de la invención.

40 La sobreexpresión de al menos un antígeno usará un promotor de la invención, pero estos promotores pueden usarse en conjunto con otras técnicas. Por ejemplo, los promotores pueden usarse en conjunto con la inactivación del represor, en la que se inactiva una proteína que reprime la expresión de un antígeno de interés. Esta inactivación significa que la represión no se produce y que el antígeno de interés puede expresarse en un nivel superior.

45 Por ejemplo, cuando se sobreexpresa NadA, el gen *NadA* puede usar un promotor de la invención, pero además puede suprimirse el gen que codifica NadR (NMB1843). NadR es una proteína represora transcripcional [32], que regula negativamente o reprime el gen que codifica NadA en todas las cepas sometidas a ensayo. La inactivación de NadR da como resultado la expresión constitutiva de NadA. Una forma alternativa a la sobreexpresar NadA es añadir 4-hidroxifenilacético al medio de cultivo. De este modo, los promotores de la invención pueden usarse como una estrategia de sobreexpresión por sí solos o en combinación con otros enfoques.

En una realización preferida, un meningococo de acuerdo con la invención sobreexpresa NadA.

50 En una realización preferida, un meningococo de acuerdo con la invención sobreexpresa NHBA.

En una realización preferida, un meningococo de acuerdo con la invención sobreexpresa fHbp.

Un meningococo de acuerdo con la invención puede sobreexpresar tanto NHBA como NadA.

Un meningococo de acuerdo con la invención puede sobreexpresar tanto fHbp como NadA.

Un meningococo de acuerdo con la invención puede sobreexpresar tanto fHbp como NHBA.

Un meningococo de acuerdo con la invención puede sobreexpresar fHbp, NHBA como NadA.

Además de sobreexpresar NHBA y/o NadA, un meningococo de acuerdo con la invención puede sobreexpresar uno o más antígenos adicionales. Por ejemplo, la bacteria puede sobreexpresar uno o más de: (a) NhhA; (b) TbpA; (c) HmbR; (d) TbpB; (e) NspA; (f) Cu,Zn-superóxido dismutasa; (g) Omp85; (h) App; y/o (i) fHbp. La sobreexpresión de la NhhA ya se ha publicado en las referencias 5 y 33. La sobreexpresión de la TbpA ya se ha publicado en las referencias 5, 33 y 34. La sobreexpresión de HmbR ya se ha publicado en la referencia 35. La sobreexpresión de TbpB ya se ha publicado en referencia 34. La sobreexpresión de NspA ya se ha publicado en la referencia 36, en combinación con la inactivación de *porA* y *cps*. La sobreexpresión de la Cu,Zn-superóxido dismutasa ya se ha publicado en la referencia 34. La sobreexpresión de fHbp ya se ha publicado en las referencias 1-3 y 31 y por un enfoque diferente (que expresa un FNR mutante constitutivamente activo) en las referencias 37 y 38. Cuando se sobreexpresa más de un antígeno, se sobreexpresará al menos un antígeno usando un promotor de la invención y puede sobreexpresarse más de un antígeno usando un promotor de la invención.

En algunas realizaciones un meningococo sobreexpresa NHBA, NadA y fHbp. Estos tres antígenos son componentes de la "vacuna universal" desvelada en la referencia 39 o "4CMenB" [40, 41].

Una cepa modificada sobreexpresadora generalmente será isogénica con su cepa original, a excepción de una modificación genética. Como resultado de la modificación, la expresión del antígeno de interés en la cepa modificada es mayor (en las mismas condiciones) que en la cepa parental.

Bacterias

Como se ha mencionado anteriormente, se preparan vesículas a partir meningococos que sobreexpresan el antígeno o antígenos pertinentes debido a la modificación genética, implicando al menos el uso de un promotor de la invención. La invención también proporciona estas bacterias meningocócicas. Además de incluir un promotor de la invención, los meningococos pueden incluir una o más modificaciones adicionales. Por ejemplo, puede tener una inactivación de uno o más de *lpxL1*, *lgtA*, *lgtB*, *porA*, *frpB*, *synX*, *mltA* y/o *lst*. Por ejemplo, la referencia 42 publica una vacuna de VMEN preparada a partir de bacterias que tienen genes *synX*, *lpxL1* y *lgtA* inactivados. Se prefiere en particular la inactivación de al menos *lpxL1* y/o *synX*.

La bacteria meningocócica puede tener niveles de endotoxinas bajos, conseguidos por inactivación de enzimas implicadas en la biosíntesis de LPS [43, 44].

La bacteria meningocócica puede ser de cualquier serogrupo, por ejemplo, A, B, C, W135 o Y. Es preferentemente del serogrupo B.

La bacteria meningocócica puede ser de cualquier serotipo (por ejemplo, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), cualquier serosubtipo y cualquier inmunotipo (por ejemplo, L1; L2; L3; L3,3,7; L10; etc.). Pueden prepararse vesículas de forma útil a partir de cepas que tienen una de los siguientes subtipos: P1.2; P1.2,5; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.5,c; P1.5c,10; P1.7,16; P1.7,16b; P1.7h,4; P1.9; P1.15; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.21,16; P1.22,14.

La bacteria meningocócica puede ser de cualquier linaje adecuado, incluyendo los linajes hiperinvasivo e hipervirulento, por ejemplo, cualquiera de los siete linajes hipervirulentos siguientes: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complejo ET-5; complejo ET-37; agrupamiento A4; linaje 3. Estos linajes se han definido mediante electroforesis de enzimas multilocus (EEML), pero también se ha usado la tipificación de secuencia de multilocus (TSML) para clasificar los meningococos [ref. 45], por ejemplo, el complejo ET-37 es el complejo ST-11 por TSML, el complejo ET-5 es ST-32 (ET-5), el linaje 3 es ST-41/44, etc.

Una bacteria puede incluir una o más de las mutaciones de inactivación y/o sobreexpresión desveladas en las referencias 8, 36, 46 y 47. Los genes adecuados para la modificación incluyen: (a) *Cps*, *CtrA*, *CtrB*, *CtrC*, *CtrD*, *FrpB*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* y/o *TbpB* [8]; (b) *CtrA*, *CtrB*, *CtrC*, *CtrD*, *FrpB*, *GalE*, *HtrB/MsbB*, *LbpA*, *LbpB*, *LpxK*, *Opa*, *Opc*, *PhoP*, *PilC*, *PmrE*, *PmrF*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* y/o *TbpB*; (c) *ExbB*, *ExbD*, *rmpM*, *CtrA*, *CtrB*, *CtrD*, *GalE*, *LbpA*, *LpbB*, *Opa*, *Opc*, *PilC*, *PorB*, *SiaA*, *SiaB*, *SiaC*, *SiaD*, *TbpA* y/o *TbpB*; and (d) *CtrA*, *CtrB*, *CtrD*, *FrpB*, *OpA*, *OpC*, *PilC*, *PorB*, *SiaD*, *SynA*, *SynB* y/o *SynC*.

Como se ha mencionado anteriormente, en una realización preferida, el meningococo de la invención ventajosamente no expresa un *MltA* activo (GNA33), de manera que libera vesículas espontáneamente, por ejemplo, que contienen antígenos que se expresan usando un promotor de la invención.

Idealmente, el meningococo no expresa un LPS nativo, por ejemplo, tiene un mutante o una inactivación de *LpxL1* y/o de *LgtB*.

Cuando el meningococo tiene una inactivación, es conveniente conseguir esta inactivación mediante la inserción de una secuencia que incluya un promotor de la invención que controle la transcripción de una proteína de interés. Por ejemplo, el gen *synX* o *lpxL1* genómico puede inactivarse mediante la inserción dentro de él de una secuencia que

incluya un promotor de la invención que controle la expresión de una proteína de membrana externa tal como fHbp. De este modo, puede usarse un único evento de transformación para conseguir dos objetivos.

Un meningococo de la invención puede incluir un marcador de selección, por ejemplo, un marcador de resistencia a antibióticos.

- 5 Un meningococo puede tener una o más, o todas, las siguientes características: (i) LgtB y/o GalE regulados negativamente o inactivados para truncar el LOS meningocócico; (ii) TbpA regulado positivamente; (iii) NhhA regulado positivamente; (iv) Omp85 regulado positivamente; (v) LbpA regulado positivamente; (vi) NspA regulado positivamente; (vii) PorA inactivado; (viii) FrpB regulado negativamente o inactivado; (ix) Opa regulado negativamente o inactivado; (x) Opc regulado negativamente o inactivado; (xii) complejo de genes *cps* suprimido. Un
10 LOS truncado puede ser uno que no incluya un epítipo de sialil-lacto-N-neotetraosa, por ejemplo, podría ser un LOS deficiente en galactosa. El LOS puede no tener cadena α .

- 15 Un meningococo puede tener una o más, o todas, las siguientes características: (i) LgtA regulado negativamente o inactivado; (ii) LpxL1 regulado negativamente o inactivado; (iii) SynX regulado negativamente o inactivado; (iv) más de un subtipo de PorA, tal como dos subtipos de PorA diferentes; y/o (v) un antígeno de la membrana externa regulado positivamente, tal como NadA o fHbp.

Producción de cepas

- 20 Son cepas de partida útiles son el serogrupo de meningococo B. Son tres partir cepas meningocócicas útiles para la preparación de bacterias que sobreexpresan un antígeno de interés MC58, NZ98/254 y H44/76. MC58 tiene PorA serosubtipo 1.7,16; NZ98/254 tiene el serosubtipo P1.7-2,4; y H44/76 tiene el serosubtipo 1.7,16. También pueden usarse otras cepas con estos serosubtipos.

Vectores etc.

- 25 La invención proporciona promotores como se han descrito anteriormente. Estos pueden estar presentes en un cromosoma bacteriano o en un ácido nucleico extracromosómico o episómico, por ejemplo, dentro de un plásmido. Una bacteria puede incluir 1 o más copias del promotor de la invención. Cuando una bacteria incluye 2 copias, éstas pueden estar en el cromosoma y/o episoma o episomas.

La invención también proporciona un vector de expresión bacteriano que comprende un promotor de la invención.

Estos promotores dentro de estos vectores o bacterias pueden ser promotores 'huérfanos' sin ninguna secuencia transcribible corriente abajo, pero normalmente estarán unidos operativamente a una secuencia que se transcribe y que después se traduce para expresar una proteína de interés.

Antígenos

NHBA (Antígeno de unión a heparina de Neisseria)

- 35 Se incluyó NHBA [50] en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB2132 (número de referencia de GenBank GI:7227388; SEQ ID NO: 9 en el presente documento). Se han publicado secuencias de NHBA de muchas cepas desde entonces. Por ejemplo, pueden verse formas alélicas de NHBA (denominadas proteína '287') en las Figuras 5 y 15 de la referencia 48 y en el ejemplo 13 y la figura 21 de la referencia 49 (SEQ ID 3179 a 3184 en la misma). También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de NHBA.

- 40 Los antígenos NHBA pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 9; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 9, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Idealmente los fragmentos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 9.

- 45 Los antígenos NHBA más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9. Antígenos NHBA ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

La sobreexpresión de NHBA se ha conseguido anteriormente de diversas maneras, por ejemplo, la introducción de un gen de NHBA bajo el control de un promotor inducible por IPTG [50].

NadA (adhesina A de Neisseria)

El antígeno NadA se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB1994 (Número de referencia de GenBank GI:7227256; SEQ ID NO: 10 en el presente documento).

Las secuencias de antígeno NadA de muchas cepas se han publicado desde entonces y la actividad de la proteína como una adhesina de *Neisseria* se ha documentado bien. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de NadA.

- 5 Los antígenos NadA pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 10; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 10, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Idealmente los fragmentos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 10.
- 10 Los antígenos NadA más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10. Antígenos NadA ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto. La SEQ ID NO: 6 es uno de dichos fragmentos.

HmbR

- 15 La secuencia de HmbR de longitud completa se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB1668. (SEQ ID NO: 7 en el presente documento). La referencia 51 publica una secuencia de HmbR de una cepa diferente (SEQ ID NO: 8 en el presente documento) y la referencia 35 publica una secuencia adicional (SEQ ID NO: 19 en el presente documento). Las SEQ ID NO: 7 y 8 difieren en longitud por 1 aminoácido y tienen un 94,2 % de identidad. La SEQ ID NO: 19 es un aminoácido más corto que la SEQ ID NO: 7 y las mismas tienen un 99 % de identidad (una inserción, siete diferencias) por CLUSTALW.
- 20

- Un polipéptido puede comprender una secuencia de HmbR de longitud completa o una secuencia de HmbR parcial. De este modo, una secuencia de HmbR puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un i % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, donde el valor de i es 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o más. Como alternativa, una secuencia de HmbR puede comprender un fragmento de al menos j aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 7, donde el valor de j es 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más. Como alternativa, una secuencia de HmbR puede comprender una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos un i % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 y/o (ii) que comprende un fragmento de al menos j aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 7.
- 25

- 30 Los fragmentos de j aminoácidos pueden comprender un epítipo de la SEQ ID NO: 7. Dichos epítopos generalmente comprenden aminoácidos que se ubican en la superficie de HmbR. Los epítopos útiles incluyen aquellos con aminoácidos implicados en la unión de HmbR a hemoglobina, ya que los anticuerpos que se unen a estos epítopos pueden bloquear la capacidad de una bacteria para unirse a la hemoglobina huésped. La topología de HmbR y sus restos funcionales críticos, se investigaron en la referencia 52. Los fragmentos que conservan una secuencia transmembrana son útiles, porque pueden presentarse sobre la superficie bacteriana, por ejemplo, en las vesículas. Corresponden ejemplos de fragmentos largos de HmbR a las SEQ ID NO: 21 y 22. Si se usa HmbR soluble, sin embargo, pueden usarse secuencias que omiten la secuencia transmembrana, pero normalmente conservan un epítipo o epítopos de la porción extracelular.
- 35

- Los antígenos HmbR más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7. Antígenos HmbR ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.
- 40

fHbp (proteína de unión al factor H)

- El antígeno fHbp se ha caracterizado en detalle. También se le ha conocido como proteína '741' [SEQ ID 2535 y 2536 en la ref. 49], 'NMB1870', 'GNA1870' [53-55], 'P2086', 'LP2086' o 'ORF2086' [56-58]. Naturalmente, es una lipoproteína y en todos los serogrupos meningocócicos. La estructura del dominio inmunodominante C-terminal de fHbp ('fHbpC') se ha determinado por RMN [59]. Esta parte de la proteína forma un barril β de ocho cadenas, cuyas cadenas están conectadas por bucles de longitudes variables. El barril está precedido por una α hélice corta y por una cola flexible N-terminal.
- 45

- El antígeno fHbp se divide en tres variantes distintas [60] y se ha descubierto que el suero generado contra una familia dada es bactericida dentro de la misma familia, pero no es activo contra cepas que expresan una de las otras dos familias, es decir, hay protección cruzada intrafamiliar, pero no protección cruzada interfamiliar. Una única variante de fHbp puede incluir de forma útil un fHbp de dos o tres de las variantes. De este modo, puede ser útil usar una combinación de dos o tres fHbp diferentes, seleccionados entre: (a) una primera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un a % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1; (b) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un b % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en
- 50
- 55

un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2; y/o (c) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un c % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 3.

5 El valor de a es al menos 85, por ejemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de b es al menos 85, por ejemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de c es al menos 85, por ejemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. Los valores de a , b y c no están intrínsecamente relacionados entre sí.

10 El valor de x es al menos 7, por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de y es al menos 7, por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de z es al menos 7, por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Los valores de x , y y z no están intrínsecamente relacionados entre sí.

15 Cuando se usa una única variante de fHbp, una composición puede incluir un polipéptido que comprende (a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un a % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1; o (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un b % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2; o (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un c % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 3.

25 Cuando se usa un fHbp de dos o tres de las variantes, una composición puede incluir una combinación de dos o tres fHbp diferentes seleccionados entre: (a) un primer polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un a % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1; (b) un segundo polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un b % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2; y/o (c) un tercer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un c % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 3. El primero, segundo y tercer polipéptido tienen diferentes secuencias de aminoácidos.

35 Cuando la invención usa un fHbp de dos de las variantes, una composición puede incluir tanto: (a) un primer polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un a % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1; como (b) un segundo polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un b % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2. El primer y el segundo polipéptido tienen diferentes secuencias de aminoácidos.

40 Cuando se usa un fHbp de dos de las variantes, una composición puede incluir tanto: (a) un primer polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un a % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1; como (b) un segundo polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un c % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 3. El primer y el segundo polipéptido tienen diferentes secuencias de aminoácidos.

50 Otro fHbp útil es una de las formas modificadas desveladas, por ejemplo, en la referencia 61, por ejemplo, que comprende la SEQ ID NO: 20 o 23 de la misma. Estas formas modificadas pueden inducir respuestas de anticuerpos que son ampliamente bactericidas contra meningococos. La SEQ ID NO: 77 en la referencia 61 es otra secuencia de fHbp útil que puede usarse.

55 Una modificación útil de fHbp, incluso de las secuencias mencionadas anteriormente, es una mutación que reduce o elimina la afinidad de la proteína por el factor H. Por ejemplo, las referencias 62 y 63 desvelan dichas mutaciones en los restos Glu- 283 y/o Glu-304 por su numeración (restar 72 de este esquema de numeración para que coincida con la SEQ ID NO: 1 en el presente documento). De forma similar, las referencias 64 y 65 desvelan la mutación (por ejemplo, de la Ser) en la posición Arg-41 por su numeración (restar 7 para que coincida con la SEQ ID NO: 1) para la variante 1 y en las posiciones 80, 211, 218, 220, 222 y/o 236 por su numeración (restar 7 para que coincidan con la SEQ ID NO: 2) para la variante 2. Las alineaciones revelarán rápidamente los correspondientes restos para cualquier secuencia de fHbp de interés. La mutación Arg-41-Ser en secuencias de la variante 1 es particularmente útil.

La proteína o proteínas fHbp en una VME por lo general estará lipídada, por ejemplo, en una cisteína N-terminal. Como alternativa, pueden no estar lipídadas.

NspA (proteína de superficie A de Neisseria)

5 El antígeno NspA se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB0663 (Número de referencia de GenBank GI:7225888; SEQ ID NO: 11 en el presente documento). El antígeno se conocía previamente a partir de las referencias 66 y 67. Las secuencias del antígeno NspA de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de NspA.

10 Antígenos NspA preferidos para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 11; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 11, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos particularmente adecuados de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 11.

15 Los antígenos NspA más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11. Antígenos NspA ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

NhhA (homólogo hia de Neisseria)

20 El antígeno NhhA se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB0992 (Número de referencia de GenBank GI:7226232; SEQ ID NO: 12 en el presente documento). Las secuencias del antígeno NhhA de muchas cepas se han publicado desde entonces, por ejemplo, en la referencias 48 y 68, y se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de NhhA. También se conoce como Hsf.

25 Los antígenos NhhA pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 12; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos particularmente adecuados de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 12.

30 Los antígenos NhhA más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12. Antígenos NhhA ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

App (Proteína de adhesión y penetración)

35 El antígeno App se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB1985 (Número de referencia de GenBank GI:7227246; SEQ ID NO: 13 en el presente documento). Las secuencias de antígeno App de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se ha conocido como 'ORF1' y 'Hap'. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de App.

40 Los antígenos App pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 13; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 13, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos particularmente adecuados de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 13.

45 Los antígenos App más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13. Antígenos App ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

Omp85 (proteína de membrana externa de 85 kDa)

50 El antígeno Omp85 se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB0182 (Número de referencia de GenBank GI:7225401; SEQ ID NO: 14 en el presente documento). Las secuencias de antígeno Omp85 de muchas cepas se han publicado desde entonces. Puede encontrarse información adicional sobre Omp85 en las referencias 69 y 70. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de Omp85.

Los antígenos Omp85 pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el

95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 14; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 14, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos particularmente adecuados de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 14.

- 5 Los antígenos Omp85 más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14. Antígenos Omp85 ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

TbpA

- 10 El antígeno TbpA se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB0461 (Número de referencia de GenBank GI:7225687; SEQ ID NO: 23 en el presente documento). Las secuencias de TbpA de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de TbpA.

- 15 Los antígenos TbpA pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 23; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 23, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos particularmente adecuados de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 23.

- 20 Los antígenos TbpA más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23. Antígenos TbpA ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

TbpB

- 25 El antígeno TbpB se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB1398 (Número de referencia de GenBank GI:7225686; SEQ ID NO: 24 en el presente documento). Las secuencias de TbpB de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de TbpB.

- 30 Los antígenos TbpB pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 24; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 24, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos particularmente adecuados de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 24.

- 35 Los antígenos TbpB más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24. Antígenos TbpB ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

Cu,Zn-superóxido dismutasa

- 40 El antígeno Cu,Zn-superóxido dismutasa se incluyó en la secuencia genómica publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B como gen NMB1398 (Número de referencia de GenBank GI:7226637; SEQ ID NO: 25 en el presente documento). Las secuencias de Cu,Zn-superóxido dismutasa de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de Cu,Zn-superóxido dismutasa.

- 45 Los antígenos Cu,Zn-superóxido dismutasa pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 25; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 25, en el que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos particularmente adecuados de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 25.

- 50 Los antígenos Cu,Zn-superóxido dismutasa más útiles pueden inducir anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25. Antígenos Cu,Zn-superóxido dismutasa ventajosos pueden inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

Composiciones farmacéuticas

Las vesículas son útiles como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas inmunógenas para la administración a un paciente. Éstas incluirán, normalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un análisis minucioso de dichos vehículos está disponible en la referencia 71.

- 5 Pueden establecerse volúmenes de dosificación eficaces de forma sistemática, pero una dosis humana típica de la composición tiene un volumen de aproximadamente 0,5 ml, por ejemplo, para inyección intramuscular. La vacuna a base de VME del RIVM se administró en un volumen de 0,5 ml [72] mediante inyección intramuscular en el muslo o el brazo. MeNZB™ se administra en 0,5 ml por inyección intramuscular en el muslo anterolateral o la región deltoidea del brazo. Pueden usarse dosis similares para otras vías de administración, por ejemplo, una vacuna intranasal a base de VME para su atomización puede tener un volumen de aproximadamente 100 µl o aproximadamente 130 µl por pulverización, administrándose cuatro pulverizaciones para proporcionar una dosis total de aproximadamente 0,5 ml.

- 15 El pH de una composición farmacéutica es por lo general de entre 6 y 8, por ejemplo, de entre 6,5 y 7,5 (por ejemplo, aproximadamente 7). El pH de la vacuna a base de VME RIVM es 7,4 [73]. La vacuna a base de VME del RIVM mantiene el pH mediante el uso de un tampón de Tris 10 mM/HCl, y el pH estable en las composiciones puede mantenerse mediante el uso de un tampón, por ejemplo, un tampón de Tris, un tampón de citrato, tampón de fosfato o un tampón de histidina. De este modo, las composiciones farmacéuticas incluirán generalmente un tampón.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser estériles y/o apirógenas. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

- 20 Las composiciones para la administración a pacientes pueden ser composiciones inmunógenas, por ejemplo, vacunas. Las vacunas pueden ser o bien profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o bien terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas. Las composiciones inmunógenas utilizadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno o antígenos, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que se trata, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se trata (por ejemplo, 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 especialista de la situación médica y otros factores pertinentes.
- 25 Se espera que la cantidad pertenezca a un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse mediante ensayos habituales. El contenido antigénico de las composiciones inmunológicas generalmente se expresará en términos de la cantidad de proteína por dosis. Una dosis de aproximadamente 0,9 mg de proteína por ml es habitual para vacunas intranasales basadas en VME. Las composiciones pueden incluir un adyuvante inmunológico. De este modo, por ejemplo, pueden incluir un adyuvante de sal de aluminio o una emulsión de aceite-en-agua (por ejemplo, una emulsión de escualeno en agua). Las sales de aluminio adecuadas incluyen hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), (por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 74) o mezclas de los mismos. Las sales pueden tomar cualquier forma adecuada (por ejemplo, en gel, cristalina, amorfa, etc.), siendo ideal la adsorción del antígeno a la sal. La concentración de Al⁺⁺⁺ en una composición para la administración a un paciente puede ser inferior a 5 mg/ml, por ejemplo, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, etc. Un intervalo ideal es entre 0,3 y 1 mg/ml, por ejemplo, un máximo de 0,85 mg/dosis. Son particularmente adecuados los adyuvantes de hidróxido de aluminio para su uso con vacunas meningocócicas.

- 45 Los meningococos afectan a diversas áreas del cuerpo y de este modo las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en diversas formas líquidas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas para la administración pulmonar, por ejemplo, mediante un inhalador, usando una pulverización fina. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas para la administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como pulverización o gotas. Son habituales los inyectables para la administración intramuscular.

- 50 Las composiciones pueden incluir un antimicrobiano, en particular cuando se empaqueta en formato de múltiples dosis. Se encuentran habitualmente en las vacunas antimicrobianos tales como tiomersal y 2-fenoxietanol, pero es ideal usar ya sea un conservante sin mercurio o ningún conservante en absoluto.

Las composiciones pueden comprender un detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes en niveles bajos, por ejemplo, < 0,01 %.

- 55 Las composiciones pueden incluir un detergente residual (por ejemplo, desoxicolato) de la preparación de VME. La cantidad de detergente residual es idealmente inferior a 0,4 µg (por ejemplo, inferior a 0,2 µg) por cada µg de proteína MenB.

Si una composición incluye LOS, la cantidad de LOS es idealmente inferior a 0, por ejemplo, inferior a 0,05 µg) por cada µg de proteína.

Las composiciones pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para proporcionar tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl es habitual, por ejemplo, aproximadamente 9 mg/ml.

- Además de las vesículas, las composiciones inmunógenas pueden incluir antígenos proteicos solubles. Por ejemplo, una composición útil puede incluir vesículas en combinación con uno o más de (i) un antígeno NHBA (ii) un antígeno NadA y (iii) un antígeno fHbp. Por ejemplo, las vesículas pueden mezclarse con la vacuna "4CMenB" (véase anteriormente). Por ejemplo, la composición puede incluir fHbp tanto en forma soluble como también en forma vesicular sobreexpresada, siendo las dos formas variantes de fHbp diferentes, por ejemplo, variante 1 en forma soluble (como en 4CMenB) y variante 2 y/o 3 presente en la superficie de una vesícula, preparadas a partir de bacterias que expresan la secuencia de la variante 2 o 3.
- 10 De este modo, una composición puede incluir: (i) vesículas, tales como vesículas liberadas espontáneamente que presentan una secuencia de fHbp; (ii) un antígeno soluble NHBA, tal como la SEQ ID NO: 4; (iii) un antígeno fHbp soluble, tal como la SEQ ID NO: 5; y (iv) un antígeno NadA soluble, tal como la SEQ ID NO: 6.

Generalidades

- 15 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican con todo detalle en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, las referencias 75-81, etc.

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

El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm$ el 10 %.

- 20 Cuando la invención se refiere a un "epítipo", este epítipo puede ser un epítipo de células B y/o un epítipo de linfocitos T, pero por lo general será un epítipo de células B. Dichos epítipos pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [82,83] o procedimientos similares) o pueden predecirse (por ejemplo, usando el índice antigénico de Jameson-Wolf [84], enfoques basados en matriz [85], MAPITOPE [86], TEPITOPE [87,88], redes neuronales [89], OptiMer y EpiMer [90, 91], ADEPT [92], Tsites [93], hidrofilia [94], el índice antigénico [95] o los procedimientos desvelados las referencias 96-100, etc.). Los epítipos son las partes de un antígeno que son reconocidas por y se unen a los sitios de unión a antígeno de anticuerpos o receptores de linfocitos T y también pueden denominarse "determinantes antigénicos".

- 30 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos son iguales al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el % de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la ref. 101. Una alineación preferida se determina mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se desvela en la ref. 102.

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

Breve descripción de los dibujos

- 40 La Figura 1 ilustra niveles de expresión de fHbp en la misma cepa de fondo (NZ98/254) usando cinco promotores diferentes y la cepa de referencia que sobreexpresa el mismo alelo de fHbp en el mismo fondo [103, 104]. Un alelo de variante 2 de fHbp se sobreexpresó en la cepa de referencia o a partir de cualquiera de las variantes de fase de tipo silvestre 2 del promotor porA, con 11 G o 13 G en el tracto espaciador o con los promotores porA ST1, ST2 y ST3 modificados como se indica. Se cargaron transferencias Western de cantidades equivalentes de proteína total de 0,5x a 2x como se indica para cada cepa y la flecha muestra fHbp.

- 45 La Figura 2 ilustra el análisis comparativo de la expresión de fHbp a partir de los promotores modificados porA y 16S. La cepa NZ98/254 que expresa variante 2 de fHbp bajo el control de los promotores indicados se cultivó en placas (A) y en líquido hasta la fase logarítmica (B) y estacionaria (C) y se midieron los niveles de expresión de fHbp mediante transferencia Western a partir de cultivos duplicados (n.º 1, n.º 2) o a partir de la cepa de sobreexpresión de referencia. La flecha continua muestra fHbp, mientras que la flecha discontinua inferior muestra un control de carga.

- 50 La Figura 3 muestra la expresión de fHbp a partir de tres cepas: (a) una inactivación de Δ pxL1; (b) una inactivación de Δ synX; y (c) una doble inactivación de Δ pxL1AsynX. En todos los casos el gen o genes inactivados se reemplazaron por fHbp bajo el control de un promotor PorA modificado. La expresión de fHbp se evaluó mediante transferencia Western en extractos de células en bruto usando suero anti-fHbp y se comparó con Hfq como control. La Figura 3A muestra la transferencia Western y la Figura 3B cuantifica la expresión en

55

unidades arbitrarias.

La Figura 4 muestra los niveles de fHbp en vesículas aisladas de cepas con inactivación de (i) $\Delta pxL1\Delta synX$ y (ii) $\Delta pxL1\Delta synX\Delta mtA$. La Figura 4A muestra el rendimiento en mg/DO y la Figura 4B es una transferencia Western de vesículas de 0,5 μ g.

- 5 La Figura 5 muestra la expresión de fHbp en dos cepas que sobreexpresan fHbp ya sea variante 1 o variante 2 en loci distintos (calles C y D) o una cepa que sobreexpresa tanto variante 1 como variante 2 en loci respectivos (calle e). La calle A es la cepa de tipo silvestre y la calle B es una inactivación de $\Delta fHbp$ de esa cepa.

La Figura 6 muestra una EGPA-DSS teñido con plata de vesículas purificadas a partir de la triple inactivación.

Modos de realizar la invención

10 Promotores *PorA* modificados

Las secuencias corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de dos variantes de fase del promotor *porA* meningocócico de tipo silvestre, que contienen 11 y 13 G consecutivas en la región espaciadora, son como se indica a continuación, con las regiones -35 y -10 subrayadas:

15 AAAAAATGGTTTTTTTTCGCGGGGGGGGGGGTATAATTGAAGAC (SEQ ID NO: 31)
AAAAATGGTTTTTTTTCGCGGGGGGGGGGGTATAATTGAAGAC (SEQ ID NO: 40)

La secuencia intermedia entre las regiones -35 y -10 incluye una secuencia de G₁₁poli-G que está conectado a la variación de fase de la expresión de *PorA*. Para estabilizar la expresión de este promotor, se sometieron a ensayo tres modificaciones (modificaciones en minúsculas):

20 AAAAAATGGTTTTTTTTCGCGaGGGaGGtGGTATAATTGAAGAC ("ST1"; SEQ ID NO: 32)
AAAAATtGacaTTTTTCGCGaGGGaGGtGGTATAATTGAAGAC ("ST2"; SEQ ID NO: 33)
AAAAATtGacaTTTTTCGCGaGGGaGGtGGTATAATTGAAGAC ("ST3"; SEQ ID NO: 34)

De este modo, en "ST1" la secuencia de G₁₁ se interrumpió en tres lugares, dejando no más de 3 restos de G consecutivos. En "ST2" se usó la misma secuencia intermedia, pero la región -35 y se sustituyó por una región -35 de consenso TTGACA. En "ST3" se insertó un resto T adicional inmediatamente corriente abajo de la región -35.

- 25 Estos tres promotores se usaron para impulsar la expresión de una secuencia de fHbp (fHbp variante 2) en la cepa NZ98/258. Los tres promotores modificados dieron como resultado una sobreexpresión de alto nivel de fHbp en la cepa en comparación con una cepa sobreexpresadora equivalente que se ha notificado en la bibliografía [103, 104]. La mejor expresión se observó con ST2 (Figuras 1 y 2).

Promotores de ARNr modificados (no dentro del ámbito de la presente invención)

- 30 En experimentos adicionales el promotor de ARNr 16S se fusionó al UTR 5' del gen *porA*:

ATATCTTGACAGGCGGAAGGAATACTTTATAATTCGCAAC... (SEQ ID NO: 35)

Este promotor se sometió a mutación y se secuenciaron tres variantes corriente abajo de la región -35 como se indica a continuación:

35 ATATCTTGACAGGCGGAAGGAATACTTTATAATTCGCAAC ("wt"; SEQ ID NO: 35)
ATATCTTGACAGGCGGAAGGAATACTTTATAATTCGCAAC... ("n.º 5"; SEQ ID NO: 36)
ATATCTTGACAGGCGGAAGGAATACTTTATAATTCGCAC... ("n.º 6"; SEQ ID NO: 37)
ATATCTTGACAGGCGGAAGGAACTTTATAATTCGCAAC... ("n.º 8"; SEQ ID NO: 38)

- 40 De este modo, en las variantes n.º 5 y n.º 6 la secuencia -10 es un pentámero y la variante n.º 6 además perdió un nucleótido entre la región -10 y el sitio de inicio de la transcripción. En la variante n.º 8 la región -10 y su secuencia corriente abajo son iguales que en wt, pero la secuencia intermedia entre las regiones -35 y -10 es un nucleótido más corta que en wt.

Expresión de fHbp a partir de promotores modificados

- 45 Estos promotores se fusionan con la región 5'UTR del gen *porA* y se usan para impulsar la expresión de la secuencia codificante de fHbp. Como se observa en la Figura 2, las variantes n.º 5 y n.º 6 mostraron la expresión más fuerte, acercándose a los niveles observados con ST2.

La región completa que abarca el promotor de tipo silvestre (SEQ ID NO: 35), que se extiende corriente abajo en la región transcrita y también corriente arriba, era como se indica a continuación (SEQ ID NO: 41; de 358 monómeros), con las regiones -35 y -10 subrayadas y el nucleótido +1 (siguiente referencia 10) doblemente subrayado:

...CGTCTGAGTCCCCGAGTTTCAGACAGCATATTCACAAAGGCGCACCAGCCGGAGGAGGGAGAGGAAAG
 GATTGTTGGAGGCGGCGCAGTATTTAGCAGAAATAAAAAACCTTATCCGACAGCGACATGACGAATTTCCC
 CAAAAAATCCCGCTGAAAGCATTGACCGTTTTTCCCTGTGGGCGTATAGTTCGGTTCCTCGCTGCTGCAG
 AAGTGGCGGACGAACTGAAAAGTATAGCACAGAATGTTGGGGATATCGAGAGATATCTTGACAGGCGGAAG
 GAATACTTTATAATTCGCAACGTATCGGGTGTGTTGCCCGATGTTTTTAGGTTTTTATCAAATTTACAAAAG
 GAAGCC... (SEQ ID NO: 41)

De forma similar, las secuencias circundantes para las variantes n.º 5 y n.º 6 eran como se indica a continuación:

n.º 5: ...CGTCTGAGTCCCCGAGTTTCAGACAGCATATTCACAAAGGCGCACCAGCCGGAGGAGGGAGAGG
 AAAGGATTGTTGGAGGCGGCGCAGTATTTAGCAGAAATAAAAAACCTTATCCGACAGCGACATGACGAATT
 TCCCCAAAAAATCCCGCTGAAAGCATTGACCGTTTTTCCCTGTGGGCGTATAGTTCGGTTCCTCGCTGCT
 GCAGAAGTGGCGGACGAACTGAAAAGTATAGCACAGAATGTTGGGGATATCGAGAGATATCTTGACAGGCG
 GAAGGAATACTTTTATATTCGCAACGTATCGGGTGTGTTGCCNANGTTTTTAGGTTTTTATCAAATTTCAA
 AGGAAGCC... (SEQ ID NO: 42)

n.º 6: ...CGTCTGAGTCCCCGAGTTTCAGACAGCATATTCACAAAGGCGCACCAGCCGGAGGAGGGAGAGG
 AAAGGATTGTTGGAGGCGGCGCAGTATTTAGCAGAAATAAAAAACCTTATCCGACAGCGACATGACGAATT
 TCCCCAAAAAATCCCGCTGAAAGCATTGACCGTTTTTCCCTGTGGGCGTATAGTTCGGTTCCTCGCTGCT
 GCAGAAGTGGCGGACGAACTGAAAAGTATAGCACAGAATGTTGGGGATATCGAGAGATATCTTGACAGGCG
 GAAGGAATACTTTTAAATTCGCACGTATCGGGTGTGTTGCCCGATGTTTTTAGGTTTTTATTAATTTACAAA
 AGGAAGCCCATANGAATCGAACTGC... (SEQ ID NO: 43)

5 Un gen *fHbp* bajo el control de un promotor de variante se insertó de forma estable en el cromosoma de un meningococo (cepa NZ98/254) en lugar del gen o genes *lpxL1* y/o el *SynX* endógenos. Se observaron niveles de expresión ligeramente mayores en el locus *synX*, y la expresión para la cepa con ambas inserciones (doble inactivación de $\Delta lpxL1\Delta synX$) fue la suma de la expresión de los loci individuales (Figura 3).

10 También se fabricaron cepas en las que se expresaron dos variantes de fHbp diferentes (1 y 2) bajo el control de un promotor PorA modificado. La coexpresión de ambas variantes no tuvo ningún efecto negativo significativo sobre la expresión a partir de cada locus distinto y, en su lugar, dio como resultado un efecto aditivo (Figura 5).

15 La inactivación del gen endógeno *mltA* (GNA33) en la doble inactivación de $\Delta lpxL1\Delta synX$ aumentó adicionalmente los niveles de expresión y no tuvo ningún impacto negativo sobre la localización de la proteína fHbp en las vesículas de la cepa. La Figura 4 muestra niveles de fHbp en vesículas aisladas a partir de estas cepas, mostrando (A) el rendimiento de proteína (mg) con respecto a la densidad óptica (DO) del cultivo y (B) una transferencia Western anti-fHbp frente a 0,5 µg de las vesículas. La EGPA-DSS muestra que la banda de fHbp en la cepa con triple inactivación era una de las proteínas más abundantes en las vesículas, junto con PorA y PorB (Figura 6).

REFERENCIAS

- 20 [1] Koeberling y col. (2007) *Vaccine* 25:1912-20.
 [2] Koeberling y col. (2008) *J Infect Dis* 198:262-70.
 [3] Hou y col. (2005) *J Infect Dis* 192:580-90.
 [4] Documento WO2009/038889.
 [5] Bonvehí y col. (2010) *Clin Vacc Immunol* 17:1460-6.
 [6] Keiser y col. (2011) *Vaccine* 29:1413-20.
 25 [7] Pinto y col. (2011) *Vaccine* 29:7752-8.
 [8] Documento WO01/09350.
 [9] Documento WO2004/015099.
 [10] van der Ende y col. (1995) *J Bacteriol* 177:2475-80.
 [11] Gourse y col. (1986) *Cell* 44:197-205.
 [12] Hirvonen y col. (2001) *J. Bacteriol.* 183:6305-14.
 30 [13] Documento WO02/09643.
 [14] Katial y col. (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
 [15] Patente de los EE.UU. 6.180.111.
 [16] Documento WO01/34642.
 [17] Documento WO2006/046143.
 35 [18] Documento WO2004/019977.
 [19] Patente europea 0011243.
 [20] Fredriksen y col. (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
 [21] Documento WO01/91788.
 [22] Documento WO2005/004908.

- [23] Documento WO2011/036562.
 [24] Documento WO00/26384.
 [25] Documento US-6531131
 [26] Documento US-6645503
 5 [27] Claassen y col. (1996) *Vaccine* 14:1001-8.
 [28] de Kleijn y col. (2000) *Vaccine* 18:1456-66.
 [29] Documento WO03/105890.
 [30] Documento WO2006/024946
 [31] Documento WO2006/081259.
 10 [32] Schielke y col. (2009) *Mol Microbiol* 72:1054-67.
 [33] Documento WO2004/014418.
 [34] Documento WO00/25811.
 [35] Documento WO2010/070453.
 [36] Documento WO02/09746.
 15 [37] Oriente y col. (2010) *J Bacteriol* 192:691-701.
 [38] Solicitud de patente provisional de los EE.UU. 61/247.428.
 [39] Giuliani y col. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29):10834-9.
 [40] Donnelly y col. (2010) *PNAS USA* 107:19490-5.
 [41] Kimura y col. (2010) *Clin Vaccine Immunol*. 2010 PMID: 21177912.
 20 [42] Zollinger y col. (2010) *Vaccine* 28:5057-67.
 [43] Documento WO99/10497.
 [44] Steeghs y col. (2001) *The EMBO Journal* 20:6937-6945.
 [45] Maiden y col. (1998) *PNAS USA* 95:3140-3145.
 [46] Documento WO02/062378.
 25 [47] Documento WO2004/014417.
 [48] Documento WO00/66741.
 [49] Documento WO99/57280
 [50] Serruto y col. (2010) *PNAS USA* 107:3770-5.
 [51] Documento US-5.698.438.
 30 [52] Perkins-Balding y col. (2003) *Microbiology* 149:3423-35.
 [53] Massignani y col. (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
 [54] Welsch y col. (2004) *J Immunol* 172:5605-15.
 [55] Hou y col. (2005) *J Infect Dis* 192(4):580-90.
 [56] Documento WO03/063766.
 35 [57] Fletcher y col. (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100.
 [58] Zhu y col. (2005) *Infect Immun* 73(10):6838-45.
 [59] Cantini y col. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:7220-7227
 [60] Documento WO2004/048404
 [61] Documento WO2009/104097.
 40 [62] Schneider y col. (2009) *Nature* 458:890-3.
 [63] Documento WO2010/046715.
 [64] Pajon y col. (2012) *Infect Immun* 80:2667-77.
 [65] Documento WO2011/126863.
 [66] Martin y col. (1997) *J Exp Med* 185(7):1173-83.
 45 [67] Documento WO96/29412.
 [68] Documento WO01/55182.
 [69] Documento WO01/38350.
 [70] Documento WO00/23595.
 [75] *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
 50 [76] *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
 [77] Sambrook y col. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 [78] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 55 [79] Ausubel y col. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5a edición (*Current Protocols*).
 [80] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)
 [81] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2a ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag)
 [82] Geysen y col. (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
 [83] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
 60 [84] Jameson, BA y col. 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
 [85] Raddizzani y Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
 [86] Bublil y col. (2007) *Proteins* 68(1):294-304.
 [87] De Lalla y col. (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
 [88] Kwok y col. (2001) *Trends Immunol* 22:583-88.
 65 [89] Brusica y col. (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30
 [90] Meister y col. (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.

[91] Roberts y col. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
 [92] Maksyutov y Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
 [93] Feller y de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
 [94] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
 5 [95] Welling y col. (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
 [96] Davenport y col. (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
 [97] Tsurui y Takahashi (2007) *J Pharmacol Sci.* 105(4):299-316.
 [98] Tong y col. (2007) *Brief Bioinform.* 8(2):96-108.
 [99] Schirle y col. (2001) *J Immunol Methods.* 257(1-2):1-16.
 10 [100] Chen y col. (2007) *Amino Acids* 33(3):423-8.
 [101] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Suplemento 30
 [102] Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
 [103] Koeberling y col. (2009) *Clin Vaccin Immunol* 16:156-62.
 [104] Koeberling y col. (2011) *Vaccine* 29:4728-34.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NOVARTIS AG
- <120> PROMOTORES PARA UNA EXPRESIÓN AUMENTADA DE PROTEÍNAS EN MENINGOCOCOS
- 20 <130> P061061WO
- <140> PCT/_2013/_
- <141> 01-02-2013
- 25 <150> US 61/594.159
- <151> 202-02-012
- <160> 43
- 30 <170> SeqWin2010, versión 1.0
- <210> 1
- <211> 248
- 35 <212> PRT
- <213> *Neisseria meningitidis*
- <400> 1

ES 2 654 613 T3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
1 5 10 15

Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
20 25 30

Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
35 40 45

Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
50 55 60

Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
65 70 75 80

Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His
85 90 95

Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His
100 105 110

Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala
115 120 125

Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr
130 135 140

Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr
145 150 155 160

Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His
165 170 175

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

Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn
195 200 205

Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala
210 215 220

Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg
225 230 235 240

His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
245

<210> 2
<211> 247
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*
<400> 2

5

ES 2 654 613 T3

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

<210> 3
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

5

<400> 3

ES 2 654 613 T3

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

<210> 4
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Antígeno meningocócico híbrido

10

<400> 4

ES 2 654 613 T3

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
1 5 10 15

Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro
20 25 30

Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln
35 40 45

Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
50 55 60

Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
65 70 75 80

Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
85 90 95

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

Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala
115 120 125

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

Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala
145 150 155 160

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

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

Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
195 200 205

Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe
210 215 220

Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly
225 230 235 240

Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser
245 250 255

Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys
260 265 270

Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
275 280 285

Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
290 295 300

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

Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
325 330 335

ES 2 654 613 T3

Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys
 340 345 350
 Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
 355 360 365
 Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala
 370 375 380
 Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 405 410 415
 Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
 420 425 430
 Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 435 440 445
 Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460
 Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys
 465 470 475 480
 Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495
 Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510
 Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
 515 520 525
 Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540
 Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
 545 550 555 560
 Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
 565 570 575
 Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
 580 585 590
 Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
 595 600 605
 Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620
 Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640
 Ala Ala Lys Gln

<210> 5
 <211> 434
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Antígeno meningocócico híbrido

5

<400> 5

ES 2 654 613 T3

Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala
1 5 10 15

Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala
20 25 30

Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln
35 40 45

Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asp Arg His
50 55 60

Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val
65 70 75 80

Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr
85 90 95

Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp
100 105 110

Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro
115 120 125

Ala Thr Arg Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr
130 135 140

Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys
145 150 155 160

Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn
165 170 175

Tyr Val Gln Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly
180 185 190

Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys
195 200 205

Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys
210 215 220

Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp
225 230 235 240

Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp
245 250 255

Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser
260 265 270

Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe
275 280 285

Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala
290 295 300

ES 2 654 613 T3

Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe
 325 330 335
 Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala
 340 345 350
 Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu
 355 360 365
 Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His
 370 375 380
 Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser
 385 390 395 400
 Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser
 405 410 415
 Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala
 420 425 430
 Lys Gln

5 <210> 6
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 6

ES 2 654 613 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 654 613 T3

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

<210> 7

<211> 792

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 7

5

ES 2 654 613 T3

Met Lys Pro Leu Gln Met Leu Pro Ile Ala Ala Leu Val Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Phe Gly Asn Pro Val Leu Ala Ala Asp Glu Ala Ala Thr Glu Thr Thr
 20 25 30

Pro Val Lys Ala Glu Ile Lys Ala Val Arg Val Lys Gly Gln Arg Asn
 35 40 45

Ala Pro Ala Ala Val Glu Arg Val Asn Leu Asn Arg Ile Lys Gln Glu
 50 55 60

Met Ile Arg Asp Asn Lys Asp Leu Val Arg Tyr Ser Thr Asp Val Gly
 65 70 75 80

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

Glu Gly Asn Arg Val Gly Val Ser Ile Asp Gly Val Asn Leu Pro Asp
 100 105 110

Ser Glu Glu Asn Ser Leu Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Phe Asn Ser Ser
 115 120 125

ES 2 654 613 T3

Arg Leu Ser Ile Asp Pro Glu Leu Val Arg Asn Ile Glu Ile Val Lys
 130 135 140
 Gly Ala Asp Ser Phe Asn Thr Gly Ser Gly Ala Leu Gly Gly Gly Val
 145 150 155 160
 Asn Tyr Gln Thr Leu Gln Gly Arg Asp Leu Leu Leu Asp Asp Arg Gln
 165 170 175
 Phe Gly Val Met Met Lys Asn Gly Tyr Ser Thr Arg Asn Arg Glu Trp
 180 185 190
 Thr Asn Thr Leu Gly Phe Gly Val Ser Asn Asp Arg Val Asp Ala Ala
 195 200 205
 Leu Leu Tyr Ser Gln Arg Arg Gly His Glu Thr Glu Ser Ala Gly Asn
 210 215 220
 Arg Gly Tyr Ala Val Glu Gly Glu Gly Ser Gly Ala Asn Ile Arg Gly
 225 230 235 240
 Ser Ala Arg Gly Ile Pro Asp Ser Ser Lys His Lys Tyr Asn His His
 245 250 255
 Ala Leu Gly Lys Ile Ala Tyr Gln Ile Asn Asp Asn His Arg Ile Gly
 260 265 270
 Ala Ser Leu Asn Gly Gln Gln Gly His Asn Tyr Thr Val Glu Glu Ser
 275 280 285
 Tyr Asn Leu Thr Ala Ser Ser Trp Arg Glu Ala Asp Asp Val Asn Arg
 290 295 300
 Arg Arg Asn Ala Asn Leu Phe Tyr Glu Trp Met Pro Asp Ser Asn Trp
 305 310 315 320
 Leu Ser Ser Leu Lys Ala Asp Phe Asp Tyr Gln Lys Thr Lys Val Ala
 325 330 335
 Ala Val Asn Asn Lys Gly Ser Phe Pro Met Asp Tyr Ser Thr Trp Thr
 340 345 350
 Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Asp Leu Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Ser Met
 355 360 365
 Asp Thr Arg Phe Lys Arg Phe Thr Leu Arg Leu Asp Ser His Pro Leu
 370 375 380
 Gln Leu Gly Gly Gly Arg His Arg Leu Ser Phe Lys Thr Phe Val Ser
 385 390 395 400
 Arg Arg Asp Phe Glu Asn Leu Asn Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Ser Gly
 405 410 415
 Arg Val Val Arg Thr Thr Ser Ser Ile Gln His Pro Val Lys Thr Thr
 420 425 430
 Asn Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Asp Gln Ile Gln Trp Asn Asp Val Phe
 435 440 445
 Ser Ser Arg Ala Gly Ile Arg Tyr Asp His Thr Lys Met Thr Pro Gln
 450 455 460

ES 2 654 613 T3

Glu Leu Asn Ala Glu Cys His Ala Cys Asp Lys Thr Pro Pro Ala Ala
 465 470 475 480
 Asn Thr Tyr Lys Gly Trp Ser Gly Phe Val Gly Leu Ala Ala Gln Leu
 485 490 495
 Asn Gln Ala Trp Arg Val Gly Tyr Asp Ile Thr Ser Gly Tyr Arg Val
 500 505 510
 Pro Asn Ala Ser Glu Val Tyr Phe Thr Tyr Asn His Gly Ser Gly Asn
 515 520 525
 Trp Leu Pro Asn Pro Asn Leu Lys Ala Glu Arg Ser Thr Thr His Thr
 530 535 540
 Leu Ser Leu Gln Gly Arg Ser Glu Lys Gly Met Leu Asp Ala Asn Leu
 545 550 555 560
 Tyr Gln Ser Asn Tyr Arg Asn Phe Leu Ser Glu Glu Gln Lys Leu Thr
 565 570 575
 Thr Ser Gly Thr Pro Gly Cys Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Tyr Gly Ile
 580 585 590
 Cys Ser Asp Pro Tyr Lys Glu Lys Leu Asp Trp Gln Met Lys Asn Ile
 595 600 605
 Asp Lys Ala Arg Ile Arg Gly Ile Glu Leu Thr Gly Arg Leu Asn Val
 610 615 620
 Asp Lys Val Ala Ser Phe Val Pro Glu Gly Trp Lys Leu Phe Gly Ser
 625 630 635 640
 Leu Gly Tyr Ala Lys Ser Lys Leu Ser Gly Asp Asn Ser Leu Leu Ser
 645 650 655
 Thr Gln Pro Leu Lys Val Ile Ala Gly Ile Asp Tyr Glu Ser Pro Ser
 660 665 670
 Glu Lys Trp Gly Val Phe Ser Arg Leu Thr Tyr Leu Gly Ala Lys Lys
 675 680 685
 Val Lys Asp Ala Gln Tyr Thr Val Tyr Glu Asn Lys Gly Trp Gly Thr
 690 695 700
 Pro Leu Gln Lys Lys Val Lys Asp Tyr Pro Trp Leu Asn Lys Ser Ala
 705 710 715 720
 Tyr Val Phe Asp Met Tyr Gly Phe Tyr Lys Pro Ala Lys Asn Leu Thr
 725 730 735
 Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Leu Phe Asn Arg Lys Tyr Thr Thr Trp
 740 745 750
 Asp Ser Leu Arg Gly Leu Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Asn Ala Val Asp
 755 760 765
 Arg Asp Gly Lys Gly Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Pro Gly Arg Asn Tyr
 770 775 780
 Ala Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
 785 790

ES 2 654 613 T3

<211> 793
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

5 <400> 8

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

ES 2 654 613 T3

Arg Arg Asn Thr Asn Leu Phe Tyr Glu Trp Thr Pro Glu Ser Asp Arg
 305 310 315 320
 Leu Ser Met Val Lys Ala Asp Val Asp Tyr Gln Lys Thr Lys Val Ser
 325 330 335
 Ala Val Asn Tyr Lys Gly Ser Phe Pro Ile Glu Asp Ser Ser Thr Leu
 340 345 350
 Thr Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Asp Leu Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Ser
 355 360 365
 Met Asp Thr Arg Phe Lys Arg Ile Thr Leu Arg Leu Asp Ser His Pro
 370 375 380
 Leu Gln Leu Gly Gly Gly Arg His Arg Leu Ser Phe Lys Thr Phe Ala
 385 390 395 400
 Ser Arg Arg Asp Phe Glu Asn Leu Asn Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Ser
 405 410 415
 Gly Arg Val Val Arg Thr Thr Ser Ser Ile Gln His Pro Val Lys Thr
 420 425 430
 Thr Asn Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Asp Gln Ile Gln Trp Asn Asp Val
 435 440 445
 Phe Ser Ser Arg Ala Gly Ile Arg Tyr Asp His Thr Lys Met Thr Pro
 450 455 460
 Gln Glu Leu Asn Ala Glu Cys His Ala Cys Asp Lys Thr Pro Pro Ala
 465 470 475 480
 Ala Asn Thr Tyr Lys Gly Trp Ser Gly Phe Val Gly Leu Ala Ala Gln
 485 490 495
 Leu Asn Gln Ala Trp Arg Val Gly Tyr Asp Ile Thr Ser Gly Tyr Arg
 500 505 510
 Val Pro Asn Ala Ser Glu Val Tyr Phe Thr Tyr Asn His Gly Ser Gly
 515 520 525
 Asn Trp Leu Pro Asn Pro Asn Leu Lys Ala Glu Arg Thr Thr Thr His
 530 535 540
 Thr Leu Ser Leu Gln Gly Arg Ser Glu Lys Gly Thr Leu Asp Ala Asn
 545 550 555 560
 Leu Tyr Gln Ser Asn Tyr Arg Asn Phe Leu Ser Glu Glu Gln Lys Leu
 565 570 575
 Thr Thr Ser Gly Asp Val Ser Cys Thr Gln Met Asn Tyr Tyr Tyr Gly
 580 585 590
 Met Cys Ser Asn Pro Tyr Ser Glu Lys Leu Glu Trp Gln Met Gln Asn
 595 600 605
 Ile Asp Lys Ala Arg Ile Arg Gly Ile Glu Leu Thr Gly Arg Leu Asn
 610 615 620
 Val Asp Lys Val Ala Ser Phe Val Pro Glu Gly Trp Lys Leu Phe Gly
 625 630 635 640

ES 2 654 613 T3

Ser Leu Gly Tyr Ala Lys Ser Lys Leu Ser Gly Asp Asn Ser Leu Leu
645 650 655

Ser Thr Gln Pro Leu Lys Val Ile Ala Gly Ile Asp Tyr Glu Ser Pro
660 665 670

Ser Glu Lys Trp Gly Val Phe Ser Arg Leu Thr Tyr Leu Gly Ala Lys
675 680 685

Lys Val Lys Asp Ala Gln Tyr Thr Val Tyr Glu Asn Lys Gly Trp Gly
690 695 700

Thr Pro Leu Gln Lys Lys Val Lys Asp Tyr Pro Trp Leu Asn Lys Ser
705 710 715 720

Ala Tyr Val Phe Asp Met Tyr Gly Phe Tyr Lys Pro Val Lys Asn Leu
725 730 735

Thr Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Val Phe Asn Arg Lys Tyr Thr Thr
740 745 750

Trp Asp Ser Leu Arg Gly Leu Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Asn Ser Val
755 760 765

Asp Arg Asp Gly Lys Gly Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Pro Ser Arg Asn
770 775 780

Tyr Ala Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
785 790

<210> 9
<211> 488
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*

5

<400> 9

ES 2 654 613 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu
 115 120 125

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

ES 2 654 613 T3

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

ES 2 654 613 T3

Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
485

5 <210> 10
<211> 364
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 10

ES 2 654 613 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

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

ES 2 654 613 T3

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> 11
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

5

<400> 11

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

10

<210> 12
 <211> 591
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

15

<400> 12

ES 2 654 613 T3

Met Asn Lys Ile Tyr Arg Ile Ile Trp Asn Ser Ala Leu Asn Ala Trp
1 5 10 15
Val Val Val Ser Glu Leu Thr Arg Asn His Thr Lys Arg Ala Ser Ala
20 25 30
Thr Val Lys Thr Ala Val Leu Ala Thr Leu Leu Phe Ala Thr Val Gln
35 40 45
Ala Ser Ala Asn Asn Glu Glu Gln Glu Glu Asp Leu Tyr Leu Asp Pro
50 55 60
Val Gln Arg Thr Val Ala Val Leu Ile Val Asn Ser Asp Lys Glu Gly
65 70 75 80
Thr Gly Glu Lys Glu Lys Val Glu Glu Asn Ser Asp Trp Ala Val Tyr
85 90 95
Phe Asn Glu Lys Gly Val Leu Thr Ala Arg Glu Ile Thr Leu Lys Ala
100 105 110
Gly Asp Asn Leu Lys Ile Lys Gln Asn Gly Thr Asn Phe Thr Tyr Ser
115 120 125
Leu Lys Lys Asp Leu Thr Asp Leu Thr Ser Val Gly Thr Glu Lys Leu
130 135 140
Ser Phe Ser Ala Asn Gly Asn Lys Val Asn Ile Thr Ser Asp Thr Lys
145 150 155 160
Gly Leu Asn Phe Ala Lys Glu Thr Ala Gly Thr Asn Gly Asp Thr Thr
165 170 175
Val His Leu Asn Gly Ile Gly Ser Thr Leu Thr Asp Thr Leu Leu Asn
180 185 190
Thr Gly Ala Thr Thr Asn Val Thr Asn Asp Asn Val Thr Asp Asp Glu
195 200 205
Lys Lys Arg Ala Ala Ser Val Lys Asp Val Leu Asn Ala Gly Trp Asn
210 215 220
Ile Lys Gly Val Lys Pro Gly Thr Thr Ala Ser Asp Asn Val Asp Phe
225 230 235 240
Val Arg Thr Tyr Asp Thr Val Glu Phe Leu Ser Ala Asp Thr Lys Thr
245 250 255
Thr Thr Val Asn Val Glu Ser Lys Asp Asn Gly Lys Lys Thr Glu Val
260 265 270
Lys Ile Gly Ala Lys Thr Ser Val Ile Lys Glu Lys Asp Gly Lys Leu
275 280 285
Val Thr Gly Lys Asp Lys Gly Glu Asn Gly Ser Ser Thr Asp Glu Gly
290 295 300
Glu Gly Leu Val Thr Ala Lys Glu Val Ile Asp Ala Val Asn Lys Ala
305 310 315 320
Gly Trp Arg Met Lys Thr Thr Thr Ala Asn Gly Gln Thr Gly Gln Ala
325 330 335
Asp Lys Phe Glu Thr Val Thr Ser Gly Thr Asn Val Thr Phe Ala Ser
340 345 350

ES 2 654 613 T3

Gly Lys Gly Thr Thr Ala Thr Val Ser Lys Asp Asp Gln Gly Asn Ile
 355 360 365

Thr Val Met Tyr Asp Val Asn Val Gly Asp Ala Leu Asn Val Asn Gln
 370 375 380

Leu Gln Asn Ser Gly Trp Asn Leu Asp Ser Lys Ala Val Ala Gly Ser
 385 390 395 400

Ser Gly Lys Val Ile Ser Gly Asn Val Ser Pro Ser Lys Gly Lys Met
 405 410 415

Asp Glu Thr Val Asn Ile Asn Ala Gly Asn Asn Ile Glu Ile Thr Arg
 420 425 430

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

Ser Val Ser Leu Gly Ala Gly Ala Asp Ala Pro Thr Leu Ser Val Asp
 450 455 460

Gly Asp Ala Leu Asn Val Gly Ser Lys Lys Asp Asn Lys Pro Val Arg
 465 470 475 480

Ile Thr Asn Val Ala Pro Gly Val Lys Glu Gly Asp Val Thr Asn Val
 485 490 495

Ala Gln Leu Lys Gly Val Ala Gln Asn Leu Asn Asn Arg Ile Asp Asn
 500 505 510

Val Asp Gly Asn Ala Arg Ala Gly Ile Ala Gln Ala Ile Ala Thr Ala
 515 520 525

Gly Leu Val Gln Ala Tyr Leu Pro Gly Lys Ser Met Met Ala Ile Gly
 530 535 540

Gly Gly Thr Tyr Arg Gly Glu Ala Gly Tyr Ala Ile Gly Tyr Ser Ser
 545 550 555 560

Ile Ser Asp Gly Gly Asn Trp Ile Ile Lys Gly Thr Ala Ser Gly Asn
 565 570 575

Ser Arg Gly His Phe Gly Ala Ser Ala Ser Val Gly Tyr Gln Trp
 580 585 590

<210> 13
 <211> 1457
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

5

<400> 13

ES 2 654 613 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				

ES 2 654 613 T3

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
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

ES 2 654 613 T3

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

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

ES 2 654 613 T3

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
 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

ES 2 654 613 T3

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 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

ES 2 654 613 T3

Ala Gln Asp Phe Gly Lys Thr Arg Ser Ala Glu Trp Gly Val Asn Ala
 1410 1415 1420
 Glu Ile Lys Gly Phe Thr Leu Ser Leu His Ala Ala Ala Ala Lys Gly
 1425 1430 1435 1440
 Pro Gln Leu Glu Ala Gln His Ser Ala Gly Ile Lys Leu Gly Tyr Arg
 1445 1450 1455

Trp

<210> 14
 <211> 797
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

5

<400> 14

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

10

ES 2 654 613 T3

Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys
 245 250 255
 Ile Thr Val His Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile
 260 265 270
 Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu
 275 280 285
 Thr Met Lys Pro Gly Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val
 290 295 300
 Leu Gly Glu Ile Gln Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser
 305 310 315 320
 Glu Ile Ser Val Gln Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp
 325 330 335
 Phe Val Leu His Ile Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile
 340 345 350
 His Ile Thr Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu
 355 360 365
 Leu Arg Gln Met Glu Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg
 370 375 380
 Ser Lys Glu Arg Val Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe
 385 390 395 400
 Asp Ala Val Pro Leu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met
 405 410 415
 Ser Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp
 420 425 430
 Val Gln Asp Thr Gly Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn
 435 440 445
 Leu Phe Gly Thr Gly Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys
 450 455 460
 Thr Thr Leu Asn Gly Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala
 465 470 475 480
 Asp Gly Val Ser Leu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro
 485 490 495
 Arg Lys Ala Ser Thr Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly
 500 505 510
 Ala Gly Ile Arg Met Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn
 515 520 525
 Phe Gly Leu Val Ala Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala
 530 535 540
 Pro Lys His Tyr Ala Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly
 545 550 555 560
 Thr Asp Gly Ser Phe Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp
 565 570 575

ES 2 654 613 T3

Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu
580 585 590

Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr
595 600 605

Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr
610 615 620

Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly
625 630 635 640

Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu
645 650 655

Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
660 665 670

Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
675 680 685

Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg
690 695 700

Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly
705 710 715 720

Lys Thr Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln
725 730 735

Asn Ile Tyr Gly Ala Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu
740 745 750

Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly
755 760 765

Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp
770 775 780

Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
785 790 795

5 <210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Engarce
<400> 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

15 <210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Engarce

ES 2 654 613 T3

<400> 16

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

5

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> *Neisseria meningitidis*

10

<400> 17
ttgcggggg gggggggg 18

15

<210> 18
<211> 35
<212> ADN
<213> *Neisseria meningitidis*

20

<400> 18
ttgacaggcg gaaggaatac ttataattc gcaac 35

25

<210> 19
<211> 791
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 19

ES 2 654 613 T3

Met Lys Pro Leu Gln Met Leu Pro Ile Ala Ala Leu Val Gly Ser Ile
1 5 10 15

Phe Gly Asn Pro Val Leu Ala Ala Asp Glu Ala Ala Thr Glu Thr Thr
20 25 30

Pro Val Lys Ala Glu Ile Lys Ala Val Arg Val Lys Gly Gln Arg Asn
35 40 45

Ala Pro Ala Ala Val Glu Arg Val Asn Leu Asn Arg Ile Lys Gln Glu
50 55 60

Met Ile Arg Asp Asn Lys Asp Leu Val Arg Tyr Ser Thr Asp Val Gly
65 70 75 80

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

Glu Gly Asn Arg Val Gly Val Ser Ile Asp Gly Val Asn Leu Pro Asp
100 105 110

Ser Glu Glu Asn Ser Leu Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Phe Asn Ser Ser
115 120 125

Arg Leu Ser Ile Asp Pro Glu Leu Val Arg Asn Ile Glu Ile Val Lys
130 135 140

Gly Ala Asp Ser Phe Asn Thr Gly Ser Gly Ala Leu Gly Gly Gly Val
145 150 155 160

Asn Tyr Gln Thr Leu Gln Gly Arg Asp Leu Leu Leu Asp Asp Arg Gln
165 170 175

Phe Gly Val Met Met Lys Asn Gly Tyr Ser Thr Arg Asn Arg Glu Trp
180 185 190

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

ES 2 654 613 T3

Leu Leu Tyr Ser Gln Arg Arg Gly His Glu Thr Glu Ser Ala Gly Asn
 210 215 220
 Arg Gly Tyr Ala Val Glu Gly Glu Gly Ser Gly Ala Asn Ile Arg Gly
 225 230 235 240
 Ser Ala Arg Gly Ile Pro Asp Ser Ser Lys His Lys Tyr His Ser Phe
 245 250 255
 Leu Gly Lys Ile Ala Tyr Gln Ile Asn Asp Asn His Arg Ile Gly Ala
 260 265 270
 Ser Leu Asn Gly Gln Gln Gly His Asn Tyr Thr Val Glu Glu Ser Tyr
 275 280 285
 Asn Leu Thr Ala Ser Ser Trp Arg Glu Ala Asp Asp Val Asn Arg Arg
 290 295 300
 Arg Asn Ala Asn Leu Phe Tyr Glu Trp Met Pro Asp Ser Asn Trp Leu
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Lys Ala Asp Phe Asp Tyr Gln Lys Thr Lys Val Ala Ala
 325 330 335
 Val Asn Asn Lys Gly Ser Phe Pro Met Asp Tyr Ser Thr Trp Thr Arg
 340 345 350
 Asn Tyr Asn Gln Lys Asp Leu Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Ser Met Asp
 355 360 365
 Thr Arg Phe Lys Arg Phe Thr Leu Arg Leu Asp Ser His Pro Leu Gln
 370 375 380
 Leu Gly Gly Gly Arg His Arg Leu Ser Phe Lys Thr Phe Val Ser Arg
 385 390 395 400
 Arg Asp Phe Glu Asn Leu Asn Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Ser Gly Arg
 405 410 415
 Val Val Arg Thr Thr Ser Ser Ile Gln His Pro Val Lys Thr Thr Asn
 420 425 430
 Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Asp Gln Ile Gln Trp Asn Asp Val Phe Ser
 435 440 445
 Ser Arg Ala Gly Ile Arg Tyr Asp His Thr Lys Met Thr Pro Gln Glu
 450 455 460
 Leu Asn Ala Glu Cys His Ala Cys Asp Lys Thr Pro Pro Ala Ala Asn
 465 470 475 480
 Thr Tyr Lys Gly Trp Ser Gly Phe Val Gly Leu Ala Ala Gln Leu Asn
 485 490 495
 Gln Ala Trp His Val Gly Tyr Asp Ile Thr Ser Gly Tyr Arg Val Pro
 500 505 510
 Asn Ala Ser Glu Val Tyr Phe Thr Tyr Asn His Gly Ser Gly Asn Trp
 515 520 525
 Leu Pro Asn Pro Asn Leu Lys Ala Glu Arg Ser Thr Thr His Thr Leu
 530 535 540

ES 2 654 613 T3

Ser Leu Gln Gly Arg Ser Glu Lys Gly Met Leu Asp Ala Asn Leu Tyr
545 550 555 560

Gln Ser Asn Tyr Arg Asn Phe Leu Ser Glu Glu Gln Lys Leu Thr Thr
565 570 575

Ser Gly Thr Pro Gly Cys Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Tyr Gly Ile Cys
580 585 590

Ser Asp Pro Tyr Lys Glu Lys Leu Asp Trp Gln Met Lys Asn Ile Asp
595 600 605

Lys Ala Arg Ile Arg Gly Ile Glu Leu Thr Gly Arg Leu Asn Val Asp
610 615 620

Lys Val Ala Ser Phe Val Pro Glu Gly Trp Lys Leu Phe Gly Ser Leu
625 630 635 640

Gly Tyr Ala Lys Ser Lys Leu Ser Gly Asp Asn Ser Leu Leu Ser Thr
645 650 655

Gln Pro Leu Lys Val Ile Ala Gly Ile Asp Tyr Glu Ser Pro Ser Glu
660 665 670

Lys Trp Gly Val Phe Ser Arg Leu Thr Tyr Leu Gly Ala Lys Lys Ala
675 680 685

Lys Asp Ala Gln Tyr Thr Val Tyr Glu Asn Lys Gly Trp Gly Thr Pro
690 695 700

Leu Gln Lys Lys Val Lys Asp Tyr Pro Trp Leu Asn Lys Ser Ala Tyr
705 710 715 720

Val Phe Asp Met Tyr Gly Phe Tyr Lys Pro Ala Lys Asn Leu Thr Leu
725 730 735

Arg Ala Gly Val Tyr Asn Val Phe Asn Arg Lys Tyr Thr Thr Trp Asp
740 745 750

Ser Leu Arg Gly Leu Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Asn Ser Val Asp Arg
755 760 765

Asp Gly Lys Gly Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Pro Ser Arg Asn Tyr Ala
770 775 780

Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
785 790

<210> 20
<211> 147
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*

5

<400> 20

ES 2 654 613 T3

Ala Asp Glu Ala Ala Thr Glu Thr Thr Pro Val Lys Ala Glu Ile Lys
 1 5 10 15

Ala Val Arg Val Lys Gly Gln Arg Asn Ala Pro Ala Ala Val Glu Arg
 20 25 30

Val Asn Leu Asn Arg Ile Lys Gln Glu Met Ile Arg Asp Asn Lys Asp
 35 40 45

Leu Val Arg Tyr Ser Thr Asp Val Gly Leu Ser Asp Ser Gly Arg His
 50 55 60

Gln Lys Gly Phe Ala Val Arg Gly Val Glu Gly Asn Arg Val Gly Val
 65 70 75 80

Ser Ile Asp Gly Val Asn Leu Pro Asp Ser Glu Glu Asn Ser Leu Tyr
 85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Asn Phe Asn Ser Ser Arg Leu Ser Ile Asp Pro Glu
 100 105 110

Leu Val Arg Asn Ile Glu Ile Val Lys Gly Ala Asp Ser Phe Asn Thr
 115 120 125

Gly Ser Gly Ala Leu Gly Gly Gly Val Asn Tyr Gln Thr Leu Gln Gly
 130 135 140

Arg Asp Leu
 145

5

<210> 21
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 21

ES 2 654 613 T3

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

ES 2 654 613 T3

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

ES 2 654 613 T3

Lys Gly Trp Gly Thr Pro Leu Gln Lys Lys Val Lys Asp Tyr Pro Trp
 530 535 540
 Leu Asn Lys Ser Ala Tyr Val Phe Asp Met Tyr Gly Phe Tyr Lys Pro
 545 550 555 560
 Ala Lys Asn Leu Thr Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Val Phe Asn Arg
 565 570 575
 Lys Tyr Thr Thr Trp Asp Ser Leu Arg Gly Leu Tyr Ser Tyr Ser Thr
 580 585 590
 Thr Asn Ser Val Asp Arg Asp Gly Lys Gly Leu Asp Arg Tyr Arg Ala
 595 600 605
 Pro Ser Arg Asn Tyr Ala Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
 610 615 620

5 <210> 22
 <211> 768
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 22

ES 2 654 613 T3

Ala Asp Glu Ala Ala Thr Glu Thr Thr Pro Val Lys Ala Glu Ile Lys
1 5 10 15

Ala Val Arg Val Lys Gly Gln Arg Asn Ala Pro Ala Ala Val Glu Arg
20 25 30

Val Asn Leu Asn Arg Ile Lys Gln Glu Met Ile Arg Asp Asn Lys Asp
35 40 45

Leu Val Arg Tyr Ser Thr Asp Val Gly Leu Ser Asp Ser Gly Arg His
50 55 60

Gln Lys Gly Phe Ala Val Arg Gly Val Glu Gly Asn Arg Val Gly Val
65 70 75 80

Ser Ile Asp Gly Val Asn Leu Pro Asp Ser Glu Glu Asn Ser Leu Tyr
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Asn Phe Asn Ser Ser Arg Leu Ser Ile Asp Pro Glu
100 105 110

Leu Val Arg Asn Ile Glu Ile Val Lys Gly Ala Asp Ser Phe Asn Thr
115 120 125

Gly Ser Gly Ala Leu Gly Gly Gly Val Asn Tyr Gln Thr Leu Gln Gly
130 135 140

Arg Asp Leu Leu Leu Asp Asp Arg Gln Phe Gly Val Met Met Lys Asn
145 150 155 160

Gly Tyr Ser Thr Arg Asn Arg Glu Trp Thr Asn Thr Leu Gly Phe Gly
165 170 175

Val Ser Asn Asp Arg Val Asp Ala Ala Leu Leu Tyr Ser Gln Arg Arg
180 185 190

Gly His Glu Thr Glu Ser Ala Gly Asn Arg Gly Tyr Ala Val Glu Gly
195 200 205

ES 2 654 613 T3

Glu Gly Ser Gly Ala Asn Ile Arg Gly Ser Ala Arg Gly Ile Pro Asp
 210 215 220
 Ser Ser Lys His Lys Tyr His Ser Phe Leu Gly Lys Ile Ala Tyr Gln
 225 230 235 240
 Ile Asn Asp Asn His Arg Ile Gly Ala Ser Leu Asn Gly Gln Gln Gly
 245 250 255
 His Asn Tyr Thr Val Glu Glu Ser Tyr Asn Leu Thr Ala Ser Ser Trp
 260 265 270
 Arg Glu Ala Asp Asp Val Asn Arg Arg Arg Asn Ala Asn Leu Phe Tyr
 275 280 285
 Glu Trp Met Pro Asp Ser Asn Trp Leu Ser Ser Leu Lys Ala Asp Phe
 290 295 300
 Asp Tyr Gln Lys Thr Lys Val Ala Ala Val Asn Asn Lys Gly Ser Phe
 305 310 315 320
 Pro Met Asp Tyr Ser Thr Trp Thr Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Asp Leu
 325 330 335
 Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Ser Met Asp Thr Arg Phe Lys Arg Phe Thr
 340 345 350
 Leu Arg Leu Asp Ser His Pro Leu Gln Leu Gly Gly Gly Arg His Arg
 355 360 365
 Leu Ser Phe Lys Thr Phe Val Ser Arg Arg Asp Phe Glu Asn Leu Asn
 370 375 380
 Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Ser Gly Arg Val Val Arg Thr Thr Ser Ser
 385 390 395 400
 Ile Gln His Pro Val Lys Thr Thr Asn Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Asp
 405 410 415
 Gln Ile Gln Trp Asn Asp Val Phe Ser Ser Arg Ala Gly Ile Arg Tyr
 420 425 430
 Asp His Thr Lys Met Thr Pro Gln Glu Leu Asn Ala Glu Cys His Ala
 435 440 445
 Cys Asp Lys Thr Pro Pro Ala Ala Asn Thr Tyr Lys Gly Trp Ser Gly
 450 455 460
 Phe Val Gly Leu Ala Ala Gln Leu Asn Gln Ala Trp His Val Gly Tyr
 465 470 475 480
 Asp Ile Thr Ser Gly Tyr Arg Val Pro Asn Ala Ser Glu Val Tyr Phe
 485 490 495
 Thr Tyr Asn His Gly Ser Gly Asn Trp Leu Pro Asn Pro Asn Leu Lys
 500 505 510
 Ala Glu Arg Ser Thr Thr His Thr Leu Ser Leu Gln Gly Arg Ser Glu
 515 520 525
 Lys Gly Met Leu Asp Ala Asn Leu Tyr Gln Ser Asn Tyr Arg Asn Phe
 530 535 540

ES 2 654 613 T3

Leu Ser Glu Glu Gln Lys Leu Thr Thr Ser Gly Thr Pro Gly Cys Thr
 545 550 555 560
 Glu Glu Asn Ala Tyr Tyr Gly Ile Cys Ser Asp Pro Tyr Lys Glu Lys
 565 570 575
 Leu Asp Trp Gln Met Lys Asn Ile Asp Lys Ala Arg Ile Arg Gly Ile
 580 585 590
 Glu Leu Thr Gly Arg Leu Asn Val Asp Lys Val Ala Ser Phe Val Pro
 595 600 605
 Glu Gly Trp Lys Leu Phe Gly Ser Leu Gly Tyr Ala Lys Ser Lys Leu
 610 615 620
 Ser Gly Asp Asn Ser Leu Leu Ser Thr Gln Pro Leu Lys Val Ile Ala
 625 630 635 640
 Gly Ile Asp Tyr Glu Ser Pro Ser Glu Lys Trp Gly Val Phe Ser Arg
 645 650 655
 Leu Thr Tyr Leu Gly Ala Lys Lys Ala Lys Asp Ala Gln Tyr Thr Val
 660 665 670
 Tyr Glu Asn Lys Gly Trp Gly Thr Pro Leu Gln Lys Lys Val Lys Asp
 675 680 685
 Tyr Pro Trp Leu Asn Lys Ser Ala Tyr Val Phe Asp Met Tyr Gly Phe
 690 695 700
 Tyr Lys Pro Ala Lys Asn Leu Thr Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Val
 705 710 715 720
 Phe Asn Arg Lys Tyr Thr Thr Trp Asp Ser Leu Arg Gly Leu Tyr Ser
 725 730 735
 Tyr Ser Thr Thr Asn Ser Val Asp Arg Asp Gly Lys Gly Leu Asp Arg
 740 745 750
 Tyr Arg Ala Pro Ser Arg Asn Tyr Ala Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
 755 760 765

<210> 23
 <211> 915
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

5

<400> 23

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

10

ES 2 654 613 T3

Ser Asp Thr Leu Ser Lys Glu Gln Val Leu Asn Ile Arg Asp Leu Thr
65 70 75 80

Arg Tyr Asp Pro Gly Ile Ala Val Val Glu Gln Gly Arg Gly Ala Ser
85 90 95

Ser Gly Tyr Ser Ile Arg Gly Met Asp Lys Asn Arg Val Ser Leu Thr
100 105 110

Val Asp Gly Val Ser Gln Ile Gln Ser Tyr Thr Ala Gln Ala Ala Leu
115 120 125

Gly Gly Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ile Glu
130 135 140

Tyr Glu Asn Val Lys Ala Val Glu Ile Ser Lys Gly Ser Asn Ser Val
145 150 155 160

Glu Gln Gly Ser Gly Ala Leu Ala Gly Ser Val Ala Phe Gln Thr Lys
165 170 175

Thr Ala Asp Asp Val Ile Gly Glu Gly Arg Gln Trp Gly Ile Gln Ser
180 185 190

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

Leu Ala Gly Arg Ile Gly Gly Ala Glu Ala Leu Leu Ile His Thr Gly
210 215 220

Arg Arg Ala Gly Glu Ile Arg Ala His Glu Asp Ala Gly Arg Gly Val
225 230 235 240

Gln Ser Phe Asn Arg Leu Val Pro Val Glu Asp Ser Ser Asn Tyr Ala
245 250 255

Tyr Phe Ile Val Lys Glu Glu Cys Lys Asn Gly Ser Tyr Glu Thr Cys
260 265 270

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

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

Leu Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Trp Leu Phe Arg Pro Gly Phe Arg Phe
305 310 315 320

Glu Asn Lys Arg His Tyr Ile Gly Gly Ile Leu Glu His Thr Gln Gln
325 330 335

Thr Phe Asp Thr Arg Asp Met Thr Val Pro Ala Phe Leu Thr Lys Ala
340 345 350

Val Phe Asp Ala Asn Lys Lys Gln Ala Gly Ser Leu Pro Gly Asn Gly
355 360 365

Lys Tyr Ala Gly Asn His Lys Tyr Gly Gly Leu Phe Thr Asn Gly Glu
370 375 380

Asn Gly Ala Leu Val Gly Ala Glu Tyr Gly Thr Gly Val Phe Tyr Asp
385 390 395 400

ES 2 654 613 T3

Glu Thr His Thr Lys Ser Arg Tyr Gly Leu Glu Tyr Val Tyr Thr Asn
 405 410 415
 Ala Asp Lys Asp Thr Trp Ala Asp Tyr Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Arg
 420 425 430
 Gln Gly Ile Gly Leu Asp Asn His Phe Gln Gln Thr His Cys Ser Ala
 435 440 445
 Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Cys Arg Pro Ser Ala Asp Lys Pro Phe Ser
 450 455 460
 Tyr Tyr Lys Ser Asp Arg Val Ile Tyr Gly Glu Ser His Arg Leu Leu
 465 470 475 480
 Gln Ala Ala Phe Lys Lys Ser Phe Asp Thr Ala Lys Ile Arg His Asn
 485 490 495
 Leu Ser Val Asn Leu Gly Phe Asp Arg Phe Gly Ser Asn Leu Arg His
 500 505 510
 Gln Asp Tyr Tyr Tyr Gln His Ala Asn Arg Ala Tyr Ser Ser Asn Thr
 515 520 525
 Pro Pro Gln Asn Asn Gly Lys Lys Ile Ser Pro Asn Gly Ser Glu Thr
 530 535 540
 Ser Pro Tyr Trp Val Thr Ile Gly Arg Gly Asn Val Val Thr Gly Gln
 545 550 555 560
 Ile Cys Arg Leu Gly Asn Asn Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Pro Arg Ser
 565 570 575
 Ile Asn Gly Lys Ser Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Asp Asn Val Arg Leu
 580 585 590
 Gly Arg Trp Ala Asp Val Gly Ala Gly Leu Arg Tyr Asp Tyr Arg Ser
 595 600 605
 Thr His Ser Asp Asp Gly Ser Val Ser Thr Gly Thr His Arg Thr Leu
 610 615 620
 Ser Trp Asn Ala Gly Ile Val Leu Lys Pro Thr Asp Trp Leu Asp Leu
 625 630 635 640
 Thr Tyr Arg Thr Ser Thr Gly Phe Arg Leu Pro Ser Phe Ala Glu Met
 645 650 655
 Tyr Gly Trp Arg Ala Gly Val Gln Ser Lys Ala Val Lys Ile Asp Pro
 660 665 670
 Glu Lys Ser Phe Asn Lys Glu Ala Gly Ile Val Phe Lys Gly Asp Phe
 675 680 685
 Gly Asn Leu Glu Ala Ser Trp Phe Asn Asn Ala Tyr Arg Asp Leu Ile
 690 695 700
 Val Arg Gly Tyr Glu Ala Gln Ile Lys Asp Gly Lys Glu Glu Ala Lys
 705 710 715 720
 Gly Asp Pro Ala Tyr Leu Asn Ala Gln Ser Ala Arg Ile Thr Gly Ile
 725 730 735

ES 2 654 613 T3

Asn Ile Leu Gly Lys Ile Asp Trp Asn Gly Val Trp Asp Lys Leu Pro
740 745 750

Glu Gly Trp Tyr Ser Thr Phe Ala Tyr Asn Arg Val Arg Val Arg Asp
755 760 765

Ile Lys Lys Arg Ala Asp Arg Thr Asp Ile Gln Ser His Leu Phe Asp
770 775 780

Ala Ile Gln Pro Ser Arg Tyr Val Val Gly Leu Gly Tyr Asp Gln Pro
785 790 795 800

Glu Gly Lys Trp Gly Val Asn Gly Met Leu Thr Tyr Ser Lys Ala Lys
805 810 815

Glu Ile Thr Glu Leu Leu Gly Ser Arg Ala Leu Leu Asn Gly Asn Ser
820 825 830

Arg Asn Thr Lys Ala Thr Ala Arg Arg Thr Arg Pro Trp Tyr Ile Val
835 840 845

Asp Val Ser Gly Tyr Tyr Thr Val Lys Lys His Phe Thr Leu Arg Ala
850 855 860

Gly Val Tyr Asn Leu Leu Asn Tyr Arg Tyr Val Thr Trp Glu Asn Val
865 870 875 880

Arg Gln Thr Ala Gly Gly Ala Val Asn Gln His Lys Asn Val Gly Val
885 890 895

Tyr Asn Arg Tyr Ala Ala Pro Gly Arg Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Glu
900 905 910

Met Lys Phe
915

5

<210> 24
<211> 712
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*
<400> 24

ES 2 654 613 T3

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

ES 2 654 613 T3

Thr Asp Ser Asp Asn Asn Ile Tyr Ser Ser Pro Tyr Leu Lys Pro Ser
 115 120 125

Asn His Gln Asn Gly Asn Thr Gly Asn Gly Ile Asn Gln Pro Lys Asn
 130 135 140

Gln Ala Lys Asp Tyr Glu Asn Phe Lys Tyr Val Tyr Ser Gly Trp Phe
 145 150 155 160

Tyr Lys His Ala Lys Arg Glu Phe Asn Leu Lys Val Glu Pro Lys Ser
 165 170 175

Ala Lys Asn Gly Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Tyr His Gly Lys Glu Pro
 180 185 190

Ser Arg Gln Leu Pro Ala Ser Gly Lys Ile Thr Tyr Lys Gly Val Trp
 195 200 205

His Phe Ala Thr Asp Thr Lys Lys Gly Gln Lys Phe Arg Glu Ile Ile
 210 215 220

Gln Pro Ser Lys Ser Gln Gly Asp Arg Tyr Ser Gly Phe Ser Gly Asp
 225 230 235 240

Asp Gly Glu Glu Tyr Ser Asn Lys Asn Lys Ser Thr Leu Thr Asp Gly
 245 250 255

Gln Glu Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Asn Leu Glu Val Asp Phe His Asn
 260 265 270

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

Asn Gln Ala Thr Thr Thr Gln Tyr Tyr Ser Leu Glu Ala Gln Val Thr
 290 295 300

Gly Asn Arg Phe Asn Gly Lys Ala Thr Ala Thr Asp Lys Pro Gln Gln
 305 310 315 320

Asn Ser Glu Thr Lys Glu His Pro Phe Val Ser Asp Ser Ser Ser Leu
 325 330 335

Ser Gly Gly Phe Phe Gly Pro Gln Gly Glu Glu Leu Gly Phe Arg Phe
 340 345 350

Leu Ser Asp Asp Gln Lys Val Ala Val Val Gly Ser Ala Lys Thr Lys
 355 360 365

Asp Lys Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ala Ala Ala Ser Gly Gly Thr Asp
 370 375 380

Ala Ala Ala Ser Asn Gly Ala Ala Gly Thr Ser Ser Glu Asn Gly Lys
 385 390 395 400

Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Lys Leu Gly Asp Lys Glu
 405 410 415

Val Gln Lys Leu Asp Asn Phe Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp
 420 425 430

Gly Ile Met Ile Pro Leu Leu Pro Glu Ala Ser Glu Ser Gly Asn Asn
 435 440 445

ES 2 654 613 T3

Gln Ala Asn Gln Gly Thr Asn Gly Gly Thr Ala Phe Thr Arg Lys Phe
450 455 460

Asp His Thr Pro Glu Ser Asp Lys Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Gln
465 470 475 480

Thr Asn Gly Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly
485 490 495

Lys Thr Lys Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr
500 505 510

Leu Lys Tyr Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln
515 520 525

Ala Gly Glu Ser Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val Glu
530 535 540

Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu Ile Pro
545 550 555 560

Ser Glu Gln Asn Ile Val Tyr Arg Gly Ser Trp Tyr Gly Tyr Ile Ala
565 570 575

Asn Asp Lys Ser Thr Ser Trp Ser Gly Asn Ala Ser Asn Ala Thr Ser
580 585 590

Gly Asn Arg Ala Glu Phe Thr Val Asn Phe Ala Asp Lys Lys Ile Thr
595 600 605

Gly Thr Leu Thr Ala Asp Asn Arg Gln Glu Ala Thr Phe Thr Ile Asp
610 615 620

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

Ser Gly Phe Asp Leu Asp Gln Ser Asn Thr Thr Arg Thr Pro Lys Ala
645 650 655

Tyr Ile Thr Asp Ala Lys Val Gln Gly Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala
660 665 670

Glu Glu Leu Gly Gly Trp Phe Ala Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Lys
675 680 685

Asn Ala Thr Asn Ala Ser Gly Asn Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly
690 695 700

Ala Lys Arg Gln Gln Pro Val Arg
705 710

<210> 25
<211> 186
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*

5

<400> 25

ES 2 654 613 T3

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

5 <210> 26
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*

10 <400> 26
 ttgcggggg gggggg 16

15 <210> 27
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*

20 <400> 27
 ttgcgaggg aggtgg 16

25 <210> 28
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 28
 ttttgcgagg gaggtgg 17

<210> 29
 <211> 16

ES 2 654 613 T3

<212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*

5 <400> 29
 ggcggaagga atactt 16

10 <210> 30
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*

15 <400> 30
 ttgacattg cgagggaggt ggtataattg aagac 35

20 <210> 31
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*

25 <400> 31
 aaaaatggtt tttgcgggg gggggggtat aattgaagac 40

30 <210> 32
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Promotor de porA modificado

40 <400> 32
 aaaaatggtt tttgcgagg gagtggtat aattgaagac 40

45 <210> 33
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*

50 <400> 33
 aaaaattgac attgcgagg gagtggtat aattgaagac 40

55 <210> 34
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Neisseria meningitidis*

60 <400> 34
 aaaattgaca tttgcgagg gagtggtat aattgaagac 40

65 <210> 35
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 654 613 T3

<223> Promotor de ARNr híbrido
 <400> 36
 atatcttgac aggcggaagg aatactttat attcgcaac 39
 5
 <210> 37
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Promotor de ARNr híbrido
 <400> 37
 15
 atatcttgac aggcggaagg aatacttta attcgcac 38
 <210> 38
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Promotor de ARNr híbrido
 <400> 38
 25
 atatcttgac aggcggaagg aaactttata attcgcaac 39
 <210> 39
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Promotor de ARNr híbrido
 35
 <400> 39
 gtatcgggtg ttgcccgat gtttttagt tttatcaaa ttacaaaag gaagcc 56
 <210> 40
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Promotor de ARNr híbrido
 45
 <400> 40
 aaaaatggtt tttgcgggg gggggggggt ataattgaag ac 42
 50
 <210> 41
 <211> 358
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Región promotora
 <400> 41
 cgtctgagtc cccgagtttc agacagcata ttcacaaagg cgcaccagcc ggaggagga 60
 gaggaagga ttggtggagg cggcgcagta tttagcagaa ataaaaaacc ttatccgaca 120
 gcgacatgac gaatttcccc aaaaaaatcc cgctgaaagc attgaccggt tttccctgtg 180
 ggcgtatagt tcggttcttc gctgctgcag aagtggcggg cgaactgaaa agtatagcac 240
 agaatggttg ggatatcgag agatatcttg acaggcggaa ggaatacttt ataattcgca 300
 60
 acgtatcggg tgtttgcccg atgttttttag gtttttatca aatttacaaa aggaagcc 358

ES 2 654 613 T3

<210> 42
 <211> 356
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Región promotora
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 318, 319, 321
 <223> 'n' es a, c, g o t
 15
 <400> 42
 cgtctgagtc cccgagtttc agacagcata ttcacaaaagg cgcaccagcc ggaggagggga 60
 gaggaaagga ttgttggagg cggcgcagta tttagcagaa ataaaaaacc ttatccgaca 120
 gcgacatgac gaatttcccc aaaaaaatcc cgctgaaagc attgaccggt tttccctgtg 180
 ggcgtatagt tcggttcttc gctgctgcag aagtggcggga cgaactgaaa agtatagcac 240
 agaatgttgg ggatatcgag agatatcttg acaggcggaa ggaatacttt atattcgcaa 300
 cgtatcgggt gtttgccnna ngtttttagg tttttatcaa atttcaaaag gaagcc 356
 20
 <210> 43
 <211> 373
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Región promotora
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 361
 <223> 'n' es a, c, g o t
 <400> 43
 cgtctgagtc cccgagtttc agacagcata ttcacaaaagg cgcaccagcc ggaggagggga 60
 gaggaaagga ttgttggagg cggcgcagta tttagcagaa ataaaaaacc ttatccgaca 120
 gcgacatgac gaatttcccc aaaaaaatcc cgctgaaagc attgaccggt tttccctgtg 180
 ggcgtatagt tcggttcttc gctgctgcag aagtggcggga cgaactgaaa agtatagcac 240
 agaatgttgg ggatatcgag agatatcttg acaggcggaa ggaatacttt taattcgcac 300
 gtatcgggtg tttgcccgat gtttttaggt ttttattaaa tttacaaaag gaagcccata 360
 ngaatcgaac tgc 373

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que comprende un promotor que tiene la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33 o la SEQ ID NO: 34.
- 5 2. Un vector de expresión bacteriano que comprende una secuencia de ADN que incluye el promotor de la reivindicación 1.
3. Un meningococo que comprende una secuencia de ADN que incluye el promotor de la reivindicación 1.
4. El meningococo de la reivindicación 3, en el que el promotor impulsa la expresión de una proteína de la membrana externa.
5. El meningococo de la reivindicación 4, en el que la proteína de la membrana externa es una fHbp.
- 10 6. El meningococo de la reivindicación 4, en el que la proteína de la membrana externa es NadA.
7. El meningococo de la reivindicación 4, en el que la proteína de la membrana externa es NHBA.
8. El meningococo de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la bacteria no expresa un MltA activo y/o en el que la bacteria tiene una inactivación de SynX y/o LpxL1.
9. El meningococo de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, con el serogrupo B.
- 15 10. El meningococo de la reivindicación 9, en el que la cepa es MC58, NZ98/254 o H44/76.

FIGURA 1

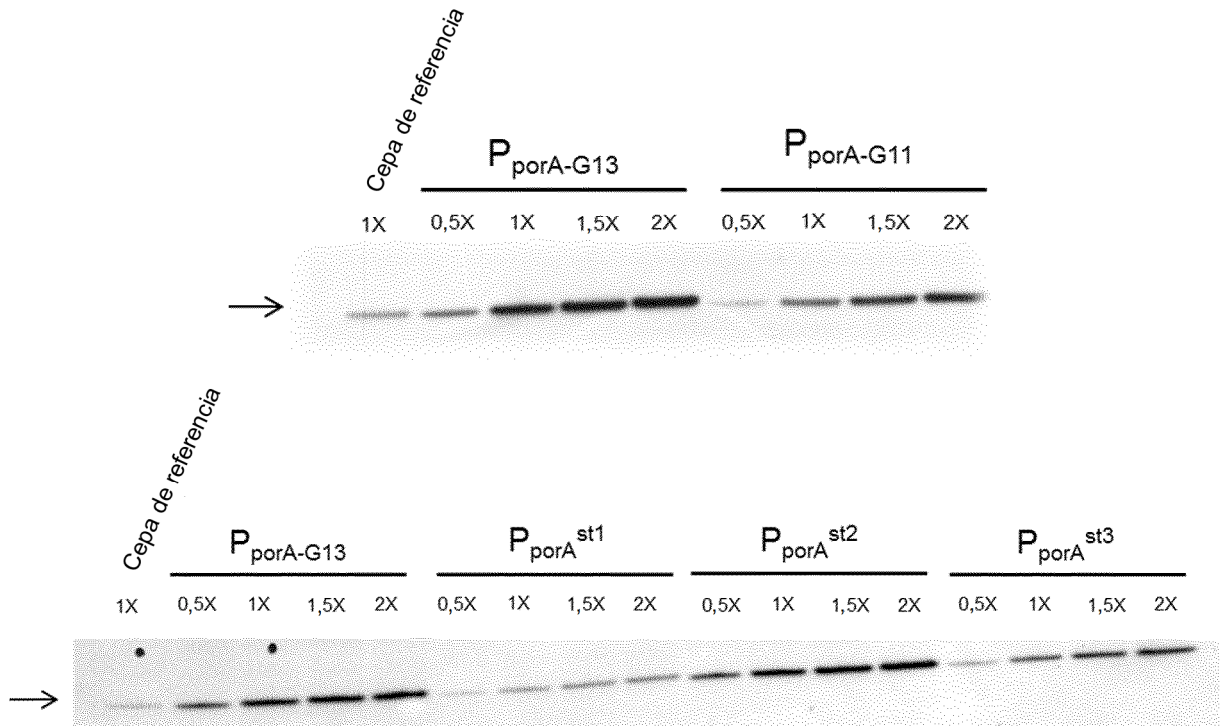


FIGURA 2

Figura 2A

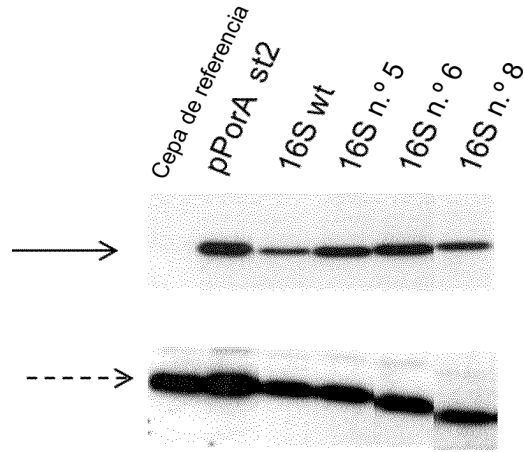


Figura 2B

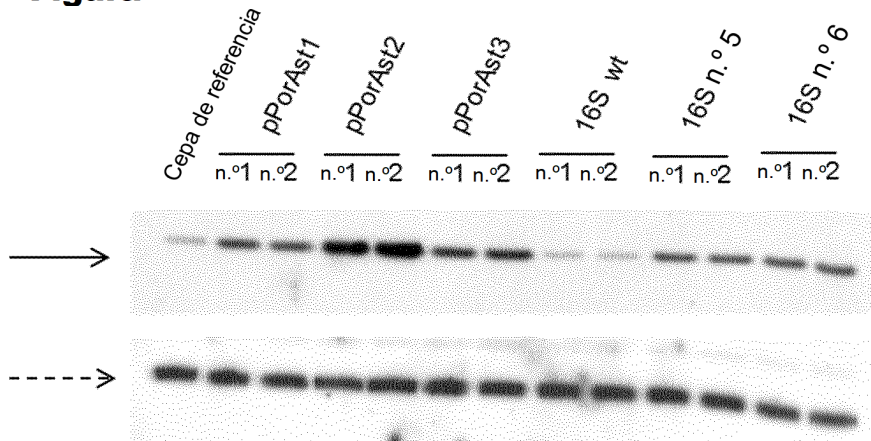


Figura 2C

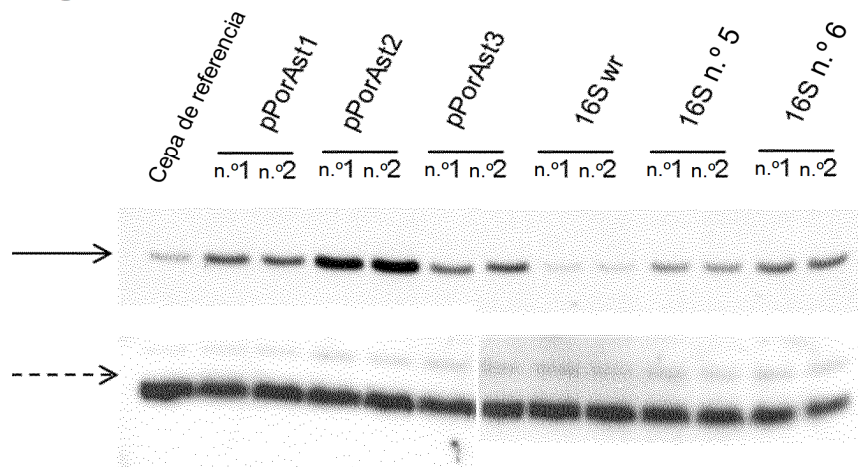


FIGURA 3

Figura 3A

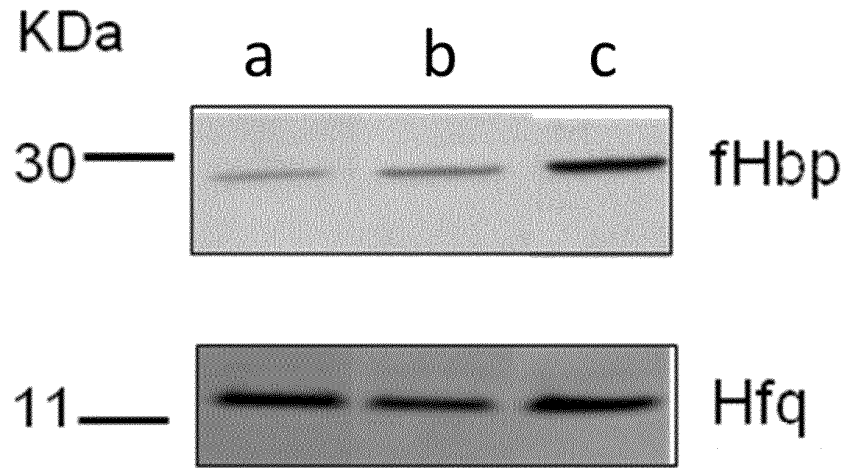


Figura 3B

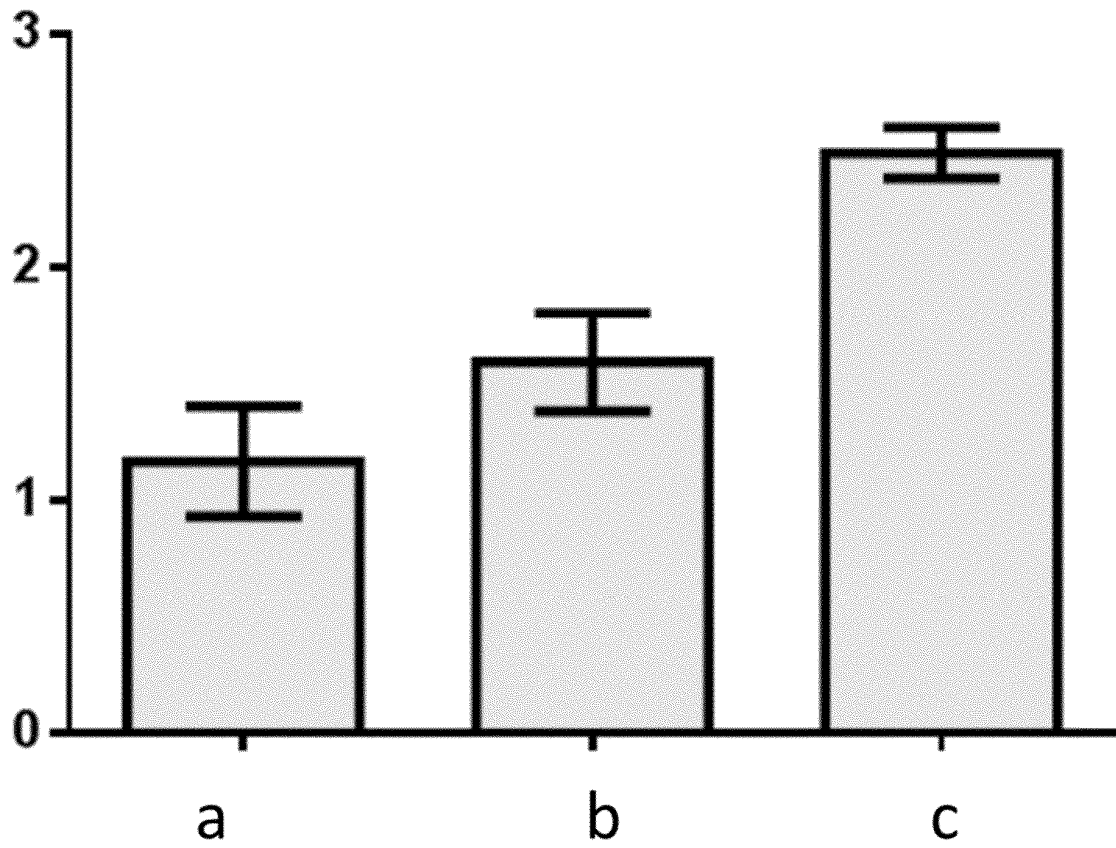


FIGURA 4

Figura 4A

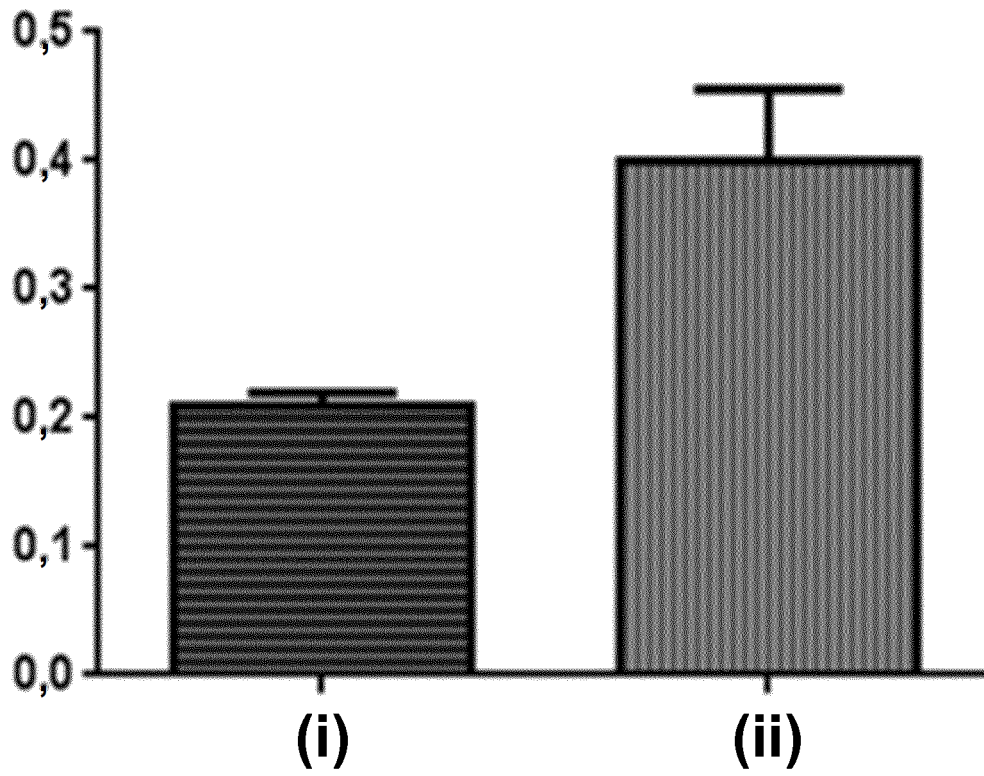


Figura 4B

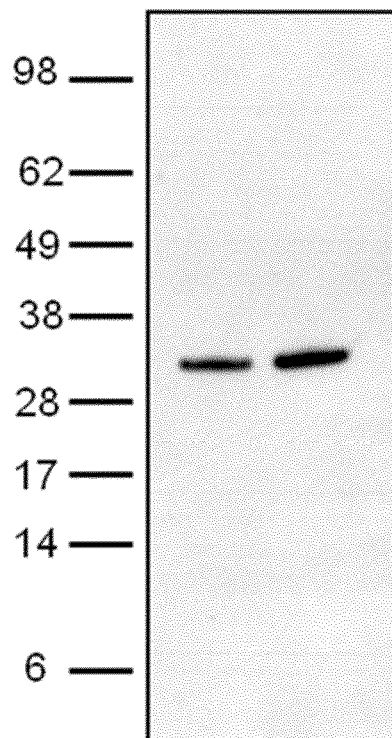


FIGURA 5

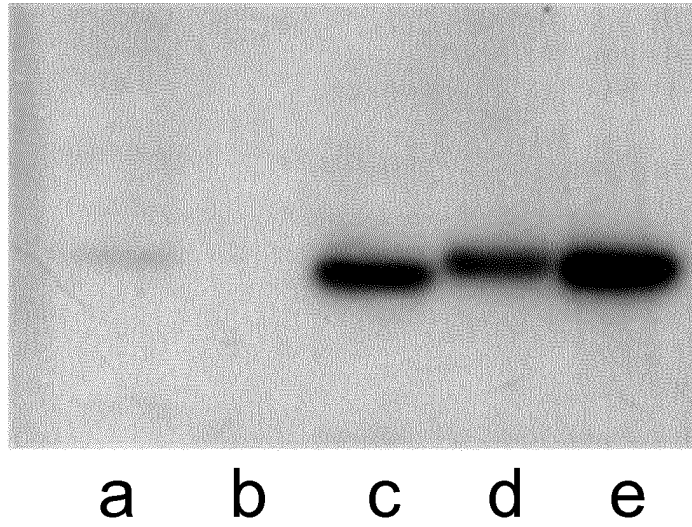


FIGURA 6

