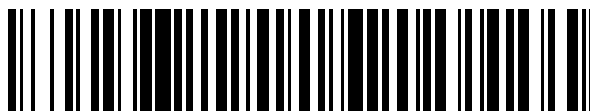


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 282**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

**C07K 14/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2011 E 16157773 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3056212**

54 Título: **Variantes no lipidadas de antígenos ORF2086 de Neisseria meningitidis**

30 Prioridad:

**10.09.2010 US 381837 P**

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

**23.10.2019**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, ANNALIESA SYBIL;  
HOISETH, SUSAN KAY;  
JANSEN, KATHRIN UTE;  
MORAN, JUSTIN KEITH y  
RUPPEN, MARK EDWARD**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 728 282 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes no lipidadas de antígenos ORF2086 de *Neisseria meningitidis*

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a variantes no lipidadas de antígenos ORF2086 de *Neisseria meningitidis* en composiciones inmunógenas según se describe en el presente documento. La presente invención también se refiere a procedimientos para conservar la conformación de las variantes no lipidadas de antígenos ORF2086 de *Neisseria meningitidis*. La presente invención también incluye composiciones y procedimientos relacionados con la expresión mejorada de antígenos no lipidados ORF2086 de *Neisseria meningitidis*, en comparación con el correspondiente antígeno de tipo silvestre.

### 10 Antecedentes de la invención

rLP2086 es una lipoproteína recombinante de 28 kDa que induce anticuerpos bacterianos de reacción cruzada contra una serie de cepas de *Neisseria meningitidis*, incluidas las cepas del serotipo B de *Neisseria meningitidis* (MnB) o, con más exactitud, cepas del serogrupo B (MnB). En base a una homología de secuencia de aminoácidos deducida se identificaron dos subfamilias diferentes de rLP2086, A y B. Estas dos subfamilias se usaron en la formulación de las muestras de la vacuna MnB-rLP2086 que contienen 20, 60, 120 y 200 µg/ml cada una en histidina 15 10 mM (pH 6,0), NaCl 150 mM y 0,5 mg/ml de aluminio con niveles variables de polisorbato 80 (PS-80). La LP2086 nativa es una lipoproteína. Fletcher y col. *Infection & Immunity*. vol. 72(4):2088-2100 (2004) demostraron que rLP2086 con un lípido en el amino terminal era más inmunógena que las versiones no lipidadas de la misma proteína en ratones. En estudios preclínicos y clínicos adicionales se ha demostrado que la combinación de estas dos 20 proteínas lipidadas puede proporcionar una amplia cobertura en la familia de fHBP.

El documento WO2007060548 desvela 2086 proteínas (llamadas NMB 1870) para aumentar la capacidad de generar anticuerpos que son de reacción cruzada entre las familias.

25 La meningitis meningocócica es una enfermedad devastadora que puede matar a niños y adultos jóvenes en horas a pesar de la disponibilidad de antibióticos. Sigue existiendo la necesidad de composiciones inmunógenas adecuadas para el meningococo del serogrupo B.

### Sumario de la invención

30 Para cumplir estas y otras necesidades de una vacuna meningocócica se han evaluado composiciones adicionales para proporcionar cobertura para el uso de variantes no lipidadas de polipéptidos ORF2086 de *N. meningitidis*. Un primer aspecto de la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende una proteína ORF2086 no lipidadada, en la que la proteína ORF2086 es una variante B22. En algunas realizaciones, la proteína ORF2086 es una variante B22.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende una variante de la subfamilia B de la proteína ORF2086 no lipidadada (polipéptido P2086 de la subfamilia B). En algunas realizaciones, el polipéptido P2086 de la subfamilia B es una variante B22. En algunas realizaciones, la composición inmunógena 35 comprende además una variante de la subfamilia A de la proteína ORF2086 no lipidadada (polipéptido P2086 de la subfamilia A). En algunas realizaciones, el polipéptido P2086 de la subfamilia A es una variante A05, una A04, una A12 o una A22.

40 En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende además un adyuvante. En algunas realizaciones, el adyuvante es un adyuvante de aluminio, una saponina, una secuencia de nucleótidos CpG o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el adyuvante de aluminio es  $AlPO_4$ ,  $Al(OH)_3$ ,  $Al_2(SO_4)_3$  o alumbre. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunógena está entre 0,125 µg/ml y 0,5 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunógena es de 0,25 µg/ml. En una realización preferida, la concentración de aluminio en la composición inmunógena está entre 0,125 mg/ml y 0,5 mg/ml. En algunas realizaciones preferidas la concentración de aluminio en la composición inmunógena 45 es 0,25 mg/ml.

En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena está entre 1 µg/ml y 250 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena está entre 10 µg/ml y 100 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena es de 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena es de 100 µg/ml. En algunas 50 realizaciones, la saponina es QS-21 Stimulon® (Agenus, Lexington, MA) o ISCOMATRIX® (CSL Limited, Parkville, Australia).

En algunas realizaciones, la composición inmunógena confiere la capacidad de producir una respuesta inmunógena a *Neisseria meningitidis* tras la administración de múltiples dosis de la composición inmunógena a un sujeto. En algunas realizaciones, la respuesta inmunógena se confiere tras la administración de dos dosis al sujeto. En algunas 55 realizaciones, la respuesta inmunógena se confiere tras la administración de tres dosis al sujeto.

- Otro aspecto de la invención proporciona una composición que confiere un incremento de la inmunogenicidad de un antígeno P2086 no lipidado, en el que la composición comprende una saponina y al menos un antígeno P2086 no lipidado. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena está entre 1 µg/ml y 250 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena está entre 10 µg/ml y 100 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena es de 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena es de 100 µg/ml. En algunas realizaciones, la saponina es QS-21 o ISCOMATRIX.
- En algunas realizaciones, la composición comprende además aluminio. En algunas realizaciones, el aluminio está presente como  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  o alumbre. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición está entre 0,125 µg/ml y 0,5 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición es de 0,25 µg/ml. En una realización preferida, la concentración de aluminio en la composición inmunógena está entre 0,125 mg/ml y 0,5 mg/ml. En algunas realizaciones preferidas la concentración de aluminio en la composición inmunógena es 0,25 mg/ml.
- En algunas realizaciones, la composición inmunógena confiere la capacidad de producir una respuesta inmunógena a *Neisseria meningitidis* tras la administración de múltiples dosis de la composición inmunógena a un sujeto. En algunas realizaciones, la respuesta inmunógena se confiere tras la administración de dos dosis al sujeto. En algunas realizaciones, la respuesta inmunógena se confiere tras la administración de tres dosis al sujeto.
- En algunas realizaciones, el antígeno P2086 no lipidado es un polipéptido P2086 de la subfamilia B. En algunas realizaciones, el polipéptido P2086 de la subfamilia B es una variante B22.
- En algunas realizaciones, la composición comprende al menos dos antígenos P2086 no lipidados, en la que los dos antígenos P2086 no lipidados son al menos un polipéptido P2086 no lipidado de la subfamilia A y al menos un polipéptido P2086 no lipidado de la subfamilia B. En algunas realizaciones, el polipéptido no lipidado P2086 de la subfamilia A es una variante A05 y el polipéptido no lipidado P2086 de la subfamilia B es una variante B22.
- Otro aspecto de la invención, la invención proporciona un procedimiento para conferir inmunidad a un sujeto contra una bacteria *Neisseria meningitidis*, en el que el procedimiento comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunógena que comprende un polipéptido P2086 no lipidado de la subfamilia B. En algunas realizaciones, el polipéptido P2086 de la subfamilia B es una variante B22. En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende además un polipéptido P2086 de la subfamilia A. En algunas realizaciones, el polipéptido P2086 de la subfamilia A es una variante A05, una A04, una A12 o una A22.
- En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende además un adyuvante. En algunas realizaciones, el adyuvante es un adyuvante de aluminio, una saponina, una secuencia de nucleótidos CpG o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el adyuvante de aluminio es  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  o alumbre. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunógena está entre 0,125 µg/ml y 0,5 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunógena es de 0,25 µg/ml. En una realización preferida, la concentración de aluminio en la composición inmunógena está entre 0,125 mg/ml y 0,5 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunógena es de 0,25 mg/ml.
- En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena está entre 1 µg/ml y 250 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena está entre 10 µg/ml y 100 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena es de 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina en la composición inmunógena es de 100 µg/ml. En algunas realizaciones, la saponina es QS-21 o ISCOMATRIX.
- En algunas realizaciones, la composición inmunógena se administra al sujeto en múltiples dosis en un programa de dosificación. En algunas realizaciones, la composición inmunógena se administra al sujeto en dos dosis en un programa de dosificación. En algunas realizaciones, la composición inmunógena se administra al sujeto en tres dosis en un programa de dosificación.
- Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para producir una variante de P2086 no lipitada que comprende las etapas de (a) clonar un ácido nucleico variante de ORF2086 en un vector de expresión para generar un vector de expresión de ORF2086; (b) transformar bacterias con el vector de expresión de ORF2086; (c) inducir la expresión de la variante de P2086 a partir del vector de expresión de ORF2086; y (d) aislar la proteína variante de P2086 expresada; en el que el vector de expresión de ORF2086 no comprende una secuencia de control de la lipidación. En algunas realizaciones, la bacteria es *E. coli*. En algunas realizaciones, la expresión se induce mediante adición de IPTG.
- En algunas realizaciones, el codón que codifica la Cys en N-terminal de la variante de P2086 está delecionado. En algunas realizaciones, el codón que codifica la Cys en N-terminal de la variante de P2086 está mutado para generar un codón Ala, Gly o Val.
- En algunas realizaciones, la cola N-terminal está mutada para añadir residuos de Ser y Gly para extender el tallo

Gly/Ser inmediatamente aguas abajo de la Cys en N-terminal. En algunas realizaciones, el número total de residuos de Gly y Ser en el tallo Gly/Ser es al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12.

En algunas realizaciones, los codones del extremo N-terminal de la variante de P2086 se optimizan por mutagénesis puntual.

5 En una realización, la presente invención se refiere a formulaciones estables de antígenos ORF2086 de la subfamilia B de *Neisseria meningitidis* en composiciones inmunógenas. La presente invención también se refiere a procedimientos para conservar la conformación de los antígenos ORF2086 de *Neisseria meningitidis* y a procedimientos para determinar la potencia de los antígenos rLP2086 de *Neisseria meningitidis*.

10 En un aspecto, la invención se refiere a una composición que incluye un polipéptido ORF2086 no lipidado aislado y no piruvilado. En una realización, la composición es inmunógena. En otra realización, el polipéptido incluye una delección de una Cys en N-terminal en comparación con el correspondiente polipéptido ORF2086 no lipidado de tipo silvestre. En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19, en el que la cisteína en la posición 1 está delecionada.

15 En otra realización más, el polipéptido está codificado por una secuencia nucleotídica que está operativamente unida a un sistema de expresión, en el que dicho sistema de expresión se puede expresar en una célula bacteriana. En una realización, el sistema de expresión es un sistema de expresión plasmídico. En una realización, la célula bacteriana es una célula de *E. coli*. En otra realización, la secuencia de nucleótidos está unida a una secuencia reguladora que controla la expresión de dicha secuencia nucleotídica.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que incluye un polipéptido ORF2086 no lipidado no piruvilado que se puede obtener mediante un procedimiento. El procedimiento incluye expresar una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19, en el que la cisteína en la posición 1 está delecionada, en el que la secuencia nucleotídica que está operativamente unida a un sistema de expresión que se puede expresar en una célula bacteriana. En una realización, la célula bacteriana es *E. coli*.

25 En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición que incluye un polipéptido aislado, que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 49 y un polipéptido aislado, que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 44. En una realización, las composiciones descritas en el presente documento son inmunógenas. En otra realización, las composiciones descritas en el presente documento incluyen además un polipéptido ORF2086 de la subfamilia A de *N. meningitidis* del serogrupo B. En otra realización, la composición descrita en el presente documento produce una respuesta inmunológica bactericida en un mamífero  
30 contra un polipéptido ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* del serogrupo B.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 49. En otro aspecto, la divulgación se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que incluye la SEQ ID NO: 46. En un aspecto, la divulgación se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que incluye la SEQ ID NO: 47. En un aspecto, la divulgación se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que incluye la SEQ ID NO: 48. En un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 50. En un aspecto, la divulgación se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que incluye la SEQ ID NO: 45. En un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 44.  
35

En un aspecto, la divulgación se refiere a un plásmido que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 y la SEQ ID NO: 45, en el que el plásmido se puede expresar en una célula bacteriana. En una realización, la célula bacteriana es *E. coli*.  
40

En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para obtener anticuerpos bactericidas específicos de un ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* de serogrupo B en un mamífero. El procedimiento incluye administrar al mamífero una cantidad de un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 49 o una combinación de los mismos.  
45

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para producir un polipéptido. El procedimiento incluye expresar en una célula bacteriana un polipéptido, que incluye una secuencia que tiene una identidad superior al 90 % con la SEQ ID NO: 21, incluyendo dicha secuencia al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 13-18 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 21-34 de SEQ ID NO: 21 y los aminoácidos 70-80 de la SEQ ID NO: 21 o una combinación de los mismos, en el que la secuencia carece de una cisteína en N-terminal. El procedimiento incluye además purificar el polipéptido. En una realización, la secuencia incluye además al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 96-116 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 158-170 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 172-185 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 187-199 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 213-224 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 226-237 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 239-248 de la SEQ ID NO: 21 o una combinación de los mismos. En una  
50 realización, la célula bacteriana es *E. coli*.  
55

En un aspecto, la invención divulga un polipéptido aislado producido por un procedimiento que incluye el

procedimiento descrito en el presente documento. En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunógena producida por un procedimiento que incluye el procedimiento descrito en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición inmunógena que incluye un polipéptido ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* de serogrupo B, en el que el polipéptido es un B44 no lipidado no piruvilado. En una realización, la composición incluye además un segundo polipéptido ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* de serogrupo B, en la que el segundo polipéptido es un B09 no lipidado no piruvilado. En una realización, la composición incluye no más de tres polipéptidos ORF2086 de la subfamilia B. En otra realización, la composición incluye no más de 2 polipéptidos ORF2086 de la subfamilia B. En una realización, la composición incluye además un polipéptido ORF2086 de la subfamilia A. En otra realización, la composición incluye un polipéptido A05 de la subfamilia A.

### **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: secuencias de ácidos nucleicos de la variante de P2086.

Figura 2: secuencias de aminoácidos de la variante de P2086. El tallo Gly/Ser en la cola N-terminal en cada variante está subrayado.

Figura 3: estructura de la proteína ORF2086

Figura 4: eliminación de la Cys en N-terminal tiene como resultado la pérdida de expresión en *E. coli*.

Figura 5: efecto de la longitud del tallo Gly/Ser en la expresión de la variante de ORF2086 no lipidada. La secuencia asociada con la variante proteica denominada B01 se expone en la SEQ ID NO: 35. La secuencia asociada con la variante proteica denominada B44 se expone en la SEQ ID NO: 36. La secuencia asociada con la variante proteica denominada A05 se expone en la SEQ ID NO: 37. La secuencia asociada con la variante proteica denominada A22 se expone en la SEQ ID NO: 38. La secuencia asociada con la variante proteica denominada B22 se expone en la SEQ ID NO: 39. La secuencia asociada con la variante proteica denominada A19 se expone en la SEQ ID NO: 40.

Figura 6: niveles elevados de expresión de B09 no lipidada a pesar de un tallo corto de Gly/Ser. Las dos calles de la izquierda demostraron expresión de la variante B09 con delección de Cys en N-terminal antes y después de inducción. Las calles tercera y cuarta demuestran expresión de la variante B09 positiva para Cys en N-terminal antes y después de inducción. La calle de más a la derecha es un patrón del peso molecular. La secuencia de aminoácidos mostrada bajo la imagen se expone en la SEQ ID NO: 41. La secuencia de nucleótidos representativa de la variante A22 con delección de Cys en N-terminal, denominada en la figura "A22\_001", se expone en la SEQ ID NO: 42, lo que se muestra en la SEQ ID NO: 41 en la figura. La secuencia de nucleótidos representativa de la variante B22 con delección de Cys en N-terminal, denominada en la figura "BA22\_001", se expone en la SEQ ID NO: 52. La secuencia de nucleótidos representativa de la variante B09 con delección de Cys en N-terminal, denominada en la figura "B09\_004", se expone en la SEQ ID NO: 53.

Figura 7: la optimización por codón incrementa la expresión de las variantes B22 y A22 no lipidadas. El panel de la izquierda demuestra expresión de la variante B22 con delección de Cys en N-terminal antes (calles 1 y 3) y después (calles 2 y 4) de la inducción con IPTG. El panel de la derecha demuestra expresión de la variante A22 con delección de Cys en N-terminal antes (calle 7) y después (calle 8) de la inducción con IPTG. Las calles 5 y 6 son patrones de peso molecular.

Figura 8: secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la variante P2086.

### **Identificadores de secuencia**

La SEQ ID NO: 1 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante A04 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.

La SEQ ID NO: 2 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante A05 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.

La SEQ ID NO: 3 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante A12 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.

La SEQ ID NO: 4 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante A12-2 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.

La SEQ ID NO: 5 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante A22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.

La SEQ ID NO: 6 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante B02 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.

La SEQ ID NO: 7 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante B03 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.

La SEQ ID NO: 8 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante B09 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.

- La SEQ ID NO: 9 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante B22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.
- La SEQ ID NO: 10 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante B24 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.
- 5 La SEQ ID NO: 11 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante B44 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye un codón que codifica una Cys en N-terminal.
- SEQ ID NO: 12 expone una secuencia de ADN para la variante A04 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- 10 SEQ ID NO: 13 expone una secuencia de ADN para la variante A05 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- SEQ ID NO: 14 expone una secuencia de ADN para la variante A12 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- SEQ ID NO: 15 expone una secuencia de ADN para la variante A22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- 15 SEQ ID NO: 16 expone una secuencia de ADN para la variante B02 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- SEQ ID NO: 17 expone una secuencia de ADN para la variante B03 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- 20 SEQ ID NO: 18 expone una secuencia de ADN para la variante B09 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- SEQ ID NO: 19 expone una secuencia de ADN para la variante B22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- SEQ ID NO: 20 expone una secuencia de ADN para la variante B24 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- 25 SEQ ID NO: 21 expone una secuencia de ADN para la variante B44 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.
- La SEQ ID NO: 22 expone una secuencia de ADN para un cebador directo, mostrado en el Ejemplo 2.
- La SEQ ID NO: 23 expone una secuencia de ADN para un cebador inverso, mostrado en el Ejemplo 2.
- La SEQ ID NO: 24 expone una secuencia de ADN para un cebador directo, mostrado en el Ejemplo 2, Tabla 1.
- 30 La SEQ ID NO: 25 expone una secuencia de ADN para un cebador inverso, mostrado en el Ejemplo 2, Tabla 1.
- La SEQ ID NO: 26 expone una secuencia de ADN para un cebador directo, mostrado en el Ejemplo 2, Tabla 1.
- La SEQ ID NO: 27 expone una secuencia de ADN para un cebador inverso, mostrado en el Ejemplo 2, Tabla 1.
- La SEQ ID NO: 28 expone una secuencia de ADN para un tallo de Gly/Ser, mostrado en el Ejemplo 4.
- 35 La SEQ ID NO: 29 expone la secuencia de aminoácidos para un tallo de Gly/Ser, mostrado en el Ejemplo 4, que está codificado por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 28.
- La SEQ ID NO: 30 expone una secuencia de ADN para un tallo de Gly/Ser, mostrado en el Ejemplo 4.
- La SEQ ID NO: 31 expone la secuencia de aminoácidos para un tallo de Gly/Ser, mostrado en el Ejemplo 4, que está codificado por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 30.
- La SEQ ID NO: 32 expone una secuencia de ADN para un tallo de Gly/Ser, mostrado en el Ejemplo 4.
- 40 La SEQ ID NO: 33 expone la secuencia de aminoácidos para un tallo de Gly/Ser, que está codificado por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 34.
- La SEQ ID NO: 34 expone una secuencia de ADN para un tallo de Gly/Ser, mostrado en el Ejemplo 4.
- La SEQ ID NO: 35 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante B01 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 5.

- La SEQ ID NO: 36 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante B44 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 5.
- La SEQ ID NO: 37 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante A05 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 5.
- 5 La SEQ ID NO: 38 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante A22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 5.
- La SEQ ID NO: 39 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante B22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 5.
- 10 La SEQ ID NO: 40 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante A19 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 5.
- La SEQ ID NO: 41 expone una secuencia de ADN para el extremo N de una variante de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 6.
- La SEQ ID NO: 42 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante A22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 6.
- 15 La SEQ ID NO: 43 expone una secuencia de ADN sometida a optimización de codones para el gen B44 de la variante de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón que codifica una cisteína en N-terminal está deletado, en comparación con la SEQ ID NO: 11. El plásmido pDK087 incluye la SEQ ID NO: 43.
- La SEQ ID NO: 44 expone la secuencia de aminoácidos para una variante B44 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, no lipídada. La SEQ ID NO: 44 es idéntica a la SEQ ID NO: 21, en la que la cisteína en N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 21 se ha deletado. La SEC ID 44 está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 43.
- 20 La SEQ ID NO: 45 expone una secuencia de ADN sometida a optimización de codones para el gen B09 de la variante de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón que codifica una cisteína en N-terminal está deletado y en la que la secuencia incluye codones que codifican una región de Gly/Ser adicional, en comparación con la SEQ ID NO: 8. El plásmido pEB063 incluye la SEQ ID NO: 45.
- 25 La SEQ ID NO: 46 expone una secuencia de ADN sometida a optimización de codones para el gen B09 de la variante de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón que codifica una cisteína en N-terminal está deletado, en comparación con la SEQ ID NO: 8. El plásmido pEB064 incluye la SEQ ID NO: 46.
- La SEQ ID NO: 47 expone una secuencia de ADN sometida a optimización de codones para el gen B09 de la variante de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón que codifica una cisteína en N-terminal está deletado, en comparación con la SEQ ID NO: 8. El plásmido pEB065 incluye la SEQ ID NO: 47.
- 30 La SEQ ID NO: 48 expone una secuencia de ADN para el gen B09 de la variante de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón que codifica una cisteína en N-terminal está deletado, en comparación con la SEQ ID NO: 8. El plásmido pLa134 incluye la SEQ ID NO: 48.
- 35 La SEQ ID NO: 49 expone la secuencia de aminoácidos para la variante B09 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, no lipídada. La SEQ ID NO: 49 es idéntica a la SEQ ID NO: 18 en la que la cisteína en N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 18 está deletada. La SEC ID 49 está codificada por, por ejemplo, una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y la SEQ ID NO: 48.
- 40 La SEC ID 50 expone la secuencia de aminoácidos para la variante B09 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón que codifica una cisteína en N-terminal está deletado y en la que la secuencia incluye codones que codifican una región de Gly/Ser adicional, en comparación con la SEQ ID NO: 18. La SEC ID 50 está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 45.
- La SEQ ID NO: 51 expone una secuencia de ADN para el gen de la variante B44 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón que codifica una cisteína en N-terminal está deletado, en comparación con la SEQ ID NO: 11. El plásmido pLN056 incluye la SEQ ID NO: 51.
- 45 La SEQ ID NO: 52 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante B22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 6.
- La SEQ ID NO: 53 expone una secuencia de ADN para el extremo N de la variante B09 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que se muestra en la Figura 6.
- 50 La SEQ ID NO: 54 expone una secuencia de ADN para un gen de la variante A05 de 2086 de *N. meningitidis*,

serogrupo B, en la que el codón que codifica una cisteína en N-terminal está delecionado, en comparación con la SEQ ID NO: 2.

5 La SEQ ID NO: 55 expone la secuencia de aminoácidos para una variante A05 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, no lipidada. La SEQ ID NO: 55 es idéntica a la SEQ ID NO: 13 en la que la cisteína en N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 13 está delecionada. La SEQ ID 55 está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 54.

La SEQ ID NO: 56 expone la secuencia de aminoácidos de una secuencia de repetición serina-glicina, mostrada en el Ejemplo 7.

10 La SEQ ID NO: 57 expone la secuencia de aminoácidos para una variante B01 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, no lipidada. La SEQ ID NO: 57 es idéntica a la SEQ ID NO: 58 en la que la cisteína en N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 58 está delecionada.

La SEQ ID NO: 58 expone la secuencia de aminoácidos para la variante B01 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.

15 La SEQ ID NO: 59 expone una secuencia de aminoácidos para la variante B15 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.

La SEQ ID NO: 60 expone una secuencia de aminoácidos para la variante B16 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, que incluye una Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1.

20 La SEQ ID NO: 61 expone una secuencia de ADN para la variante B22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón para la Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1 de la SEQ ID NO: 19 está reemplazado por un codón para una glicina.

La SEQ ID NO: 62 expone la secuencia de aminoácidos para la variante B22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que la Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1 de la SEQ ID NO: 19 está reemplazada por una glicina.

25 La SEQ ID NO: 63 expone una secuencia de ADN para la variante B22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que el codón para la Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1 de la SEQ ID NO: 15 está reemplazado por un codón para una glicina.

La SEQ ID NO: 64 expone la secuencia de aminoácidos para la variante B22 de 2086 de *N. meningitidis*, serogrupo B, en la que la Cys en N-terminal en la posición aminoacídica 1 de la SEQ ID NO: 15 está reemplazada por una glicina.

### 30 **Descripción detallada de la invención**

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que los que se entienden habitualmente por un experto en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, más adelante se describen procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

### **Definiciones**

40 Como se usa en el presente documento, las formas del singular “un”, “uno” y “el/la” incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, referencias al “procedimiento” incluyen uno o más procedimientos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que llegarán a ser evidentes para el experto en la técnica tras la lectura de esta divulgación etc.

45 Como se usa en el presente documento, las formas en plural incluyen referencias en singular, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, referencias a “los procedimientos” incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para un experto en la técnica tras la lectura de esta divulgación y así sucesivamente.

50 Como se usa en el presente documento, “aproximadamente” significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor tal como un intervalo de concentración indicado, de un marco de tiempo, de peso molecular, de temperatura o de pH. Dicho intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, normalmente, dentro del 20 %, más normalmente todavía dentro del 10 % e incluso más normalmente dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. La variación permitida abarcada por el término “aproximadamente” dependerá del sistema en concreto en estudio y un experto en la técnica lo apreciará fácilmente. Siempre que se cite un intervalo en esta solicitud, cada número entero dentro del intervalo también se contempla como una realización de la invención.



El término “adyuvante” se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno como se describe y pone de ejemplo adicionalmente en el presente documento. Ejemplos no limitantes de adyuvantes que se pueden usar en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, tales como, por ejemplo, adyuvantes completos o incompletos de Freund, copolímero de bloque (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, monofosforil lípido A y adyuvante de lípido avridina-amina.

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, a menos que el contexto indique lo contrario, con el término se pretende abarcar no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos sometidos a manipulación (p. ej., quiméricos, humanizados y/o derivatizados para alterar las funciones efectoras, la estabilidad y otras actividades biológicas) y fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), anticuerpos de cadena simple (ScFv) y anticuerpos de dominio, incluidos los anticuerpos de tiburón y de camélido) y proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos siempre que exhiban la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos como se han descrito en el presente documento y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento antigénico. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o una subclase de las mismas) y el anticuerpo no tiene que ser de ninguna clase concreta. En función de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden además dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 en seres humanos. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

“Fragmentos de anticuerpo” comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, en el que la porción retiene preferentemente, al menos una, preferentemente la mayoría o todas, de las funciones asociadas normalmente con dicha porción cuando está presente en un anticuerpo intacto.

El término “antígeno” generalmente se refiere a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido, lípido o conjugado que contiene al menos un epítipo al que un anticuerpo afín se pueden unir de forma selectiva; o en algunos casos a una sustancia inmunógena que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de linfocitos T, o ambos, en un animal, incluidas las composiciones que se inyectan o absorben en un animal. La respuesta inmunitaria se puede generar a la molécula completa o a una o diversas porciones de la molécula (p. ej., un epítipo o hapteno). El término se puede usar para hacer referencia a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno se reconoce por los anticuerpos, receptores de linfocitos T u otros elementos de inmunidad humoral y/o celular específica. El término “antígeno” incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Epítopos de un antígeno dado se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. Por ejemplo, los epítopos lineales se pueden determinar mediante, por ejemplo, síntesis concurrente de un gran número de péptidos sobre soportes sólidos, en los que los péptidos corresponden a las porciones de la molécula proteica y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos siguen unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º: 4.08.871; Geysen y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen y col. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. De forma similar, los epítopos conformacionales se pueden identificar determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*. Además, para los fines de la presente invención un “antígeno” también se puede usar para hacer referencia a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora, pero que pueden ser no conservadoras), en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como por medio de mutagénesis dirigida de sitio, o mediante procedimientos sintéticos concretos o mediante un enfoque de ingeniería genérica, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de huéspedes, que producen los antígenos. Además, el antígeno se puede derivar, obtener o aislar de un microbio, por ejemplo una bacteria, o puede ser un organismo entero. De forma similar, en la definición también se incluye un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización con ácido nucleico. Los antígenos sintéticos también están incluidos, por ejemplo poliepítopos, epítopos flanqueantes y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente (Bergmann y col. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777-2781; Bergmann y col. (1996) *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol. and Cell Biol.* 75:402-408; Gardner y col. (1998) Duodécima Conferencia Mundial del SIDA, Ginebra, Suiza, 28 de junio-3 de julio de 1998).

La expresión sustituciones “conservadoras” de aminoácidos puede realizarse sobre la base de la similitud en la

polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, triptófano y metionina; aminoácidos polares/neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; (c) aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos conservadores alteran la secuencia primaria de los polipéptidos ORF2086, pero no alteran la función de la molécula. Al generar estos mutantes se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. Generalmente en la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos a la hora de conferir la función biológica interactiva en un polipéptido (Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157(1):105-32). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituir a otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y seguir dando como resultado un polipéptido con actividad biológica similar. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga. Dichos índices son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se cree que el carácter hidropático relativo del residuo de aminoácido determina la estructura secundaria y terciaria del polipéptido resultante, que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos y similares. En la técnica se sabe que un aminoácido se puede sustituir por otro aminoácido que tenga un índice hidropático similar y seguir dando como resultado un polipéptido funcionalmente equivalente. Al realizar dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , se prefieren particularmente aquellos que están dentro de  $\pm 1$  y se prefieren todavía más particularmente aquellos dentro de  $\pm 0,5$ .

También se pueden realizar sustituciones o inserciones conservadoras de aminoácidos sobre la base de la hidrofiliidad. Como se ha descrito en la patente de EE.UU. N.º 4.554.101 la mayor hidrofiliidad media local de un polipéptido, según se dirige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica del polipéptido. La patente de EE.UU. N.º 4.554.101 cita que los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  3); glutamato (+3  $\pm$  1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5  $\pm$  1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse con otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y aún obtener un polipéptido biológicamente equivalente y en particular, inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de  $\pm 2$ ; se prefieren particularmente aquellos que están dentro de  $\pm 1$ ; y se prefieren todavía más particularmente aquellos dentro de  $\pm 0,5$ . Sustituciones ejemplares que tienen en cuenta diversas de las características anteriores se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, sin limitación: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

La expresión "cantidad inmunógena eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un polipéptido o composición que comprende un polipéptido que es eficaz en la producción de una respuesta inmunitaria en un huésped vertebrado. Por ejemplo, una cantidad inmunógena eficaz de una proteína rLP2086 de la presente invención es una cantidad que es eficaz en la producción de una respuesta inmunitaria en un huésped vertebrado. La "dosis o cantidad inmunógena eficaz" concreta dependerá de la edad, el peso y el estado médico del huésped, así como del procedimiento de administración. Las dosis adecuadas se determinan fácilmente por los expertos en la técnica.

El término "tallo de Gly/Ser", como se usa en el presente documento se refiere a la serie de residuos de Gly y Ser inmediatamente aguas abajo del residuo de Cys en N-terminal de una proteína codificada por ORF2086. Puede haber entre 5 y 12 residuos de Gly y Ser en el tallo de Gly/Ser. De acuerdo con ello, el tallo de Gly/Ser consiste en los aminoácidos 2 a entre 7 y 13 de la proteína codificada por ORF2086. Preferentemente, el tallo de Gly/Ser consiste en los aminoácidos 2 y hasta entre 7 y 13 de la proteína codificada por ORF2086. Los tallos de Gly/Ser de las variantes de P0286 de la presente invención están representados por las secuencias subrayadas en la Figura 2 (SEQ ID NO: 12-21). Como se muestra en el presente documento, la longitud del tallo de Gly/Ser puede afectar a la estabilidad o al nivel de expresión de una variante de P2086 no lipídada. En una realización de ejemplo, los efectos de afectar a la longitud del tallo de Gly/Ser se comparan con los de la variante de tipo silvestre correspondiente.

El término "inmunógeno" se refiere a la capacidad de un antígeno o una vacuna para producir una respuesta inmunitaria humoral o celular, o ambas.

Una "cantidad inmunógena" o una "cantidad inmunológicamente eficaz" o "dosis", cada uno de los cuales se usa de forma intercambiable en el presente documento, se refiere generalmente a la cantidad de antígeno o composición inmunógena suficiente para producir una respuesta inmunitaria, bien una respuesta celular (linfocito T) o bien humoral (linfocito B o anticuerpo), o bien ambas, según se mide medida mediante ensayos estándar conocidos por el experto en la técnica.

El término "composición inmunógena" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo un microorganismo, o un componente del mismo, composición que se puede usar para producir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las composiciones inmunógenas de la presente invención se pueden usar para tratar a un ser humano susceptible a la infección por *N. meningitidis*, administrando las composiciones inmunógenas por medio de una vía transdérmica sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección por vía intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intradérmica (i.d.) o subcutánea; aplicación mediante un parche u otro dispositivo de liberación transdérmica; o mediante administración mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, la composición inmunógena se puede usar en la fabricación de una vacuna o en la provocación de anticuerpos policlonales o monoclonales que se podrían usar para proteger de forma pasiva o para tratar a un sujeto.

Cantidades óptimas de componentes para una composición inmunógena concreta se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

El término "aislado" significa que el material se elimina de su entorno original (p. ej., el entorno natural si se da en la naturaleza o del organismo huésped si es una entidad recombinante, o tomado de un entorno a un entorno diferente). Por ejemplo, una proteína o péptido "aislado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que la proteína deriva o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente o, de otro modo, están presentes en una mezcla como parte de una reacción química. En la presente invención, las proteínas pueden aislarse de la célula bacteriana o de residuos celulares, de modo que se proporcionan en una forma útil en la fabricación de una composición inmunógena. El término "aislado" o "que aísla" puede incluir purificar, o purificación, incluyendo por ejemplo, los procedimientos de purificación de las proteínas, como se describen en el presente documento. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido o proteína en la que el polipéptido o proteína está separado de los componentes celulares de las células de las que se aísla o produce de forma recombinante. Por tanto, una proteína o péptido sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones del polisacárido, proteína o péptido de la cápsula que tiene menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % o 1 % (en peso seco) de proteína o polisacárido u otro material celular contaminante. Cuando el polipéptido/proteína se produce de forma recombinante, está también preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación proteica. Cuando el polipéptido o proteína se produce mediante síntesis química, preferentemente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir está separado de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína o polisacárido. De acuerdo con ello, dichas preparaciones del polipéptido o la proteína tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores químicos u otros compuestos distintos al polipéptido/proteína o fragmento polisacárido de interés.

La expresión "cola N-terminal" tal como se usa en el presente documento se refiere a la porción N-terminal de una proteína codificada por ORF2086, que fija la proteína a la membrana celular. En la parte inferior de la estructura en vista lateral de la Figura 3 se muestra una cola N-terminal. Normalmente una cola N-terminal comprende 16 aminoácidos N-terminales de la proteína codificada por ORF2086. En algunas realizaciones, la cola N-terminal está formada por los aminoácidos 1-16 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 12-21. El término "ORF2086" como se usa en el presente documento se refiere al marco de lectura abierto 2086 de una bacteria de la especie *Neisseria*. El ORF2086 de *Neisseria*, las proteínas codificadas por el mismo, los fragmentos de dichas proteínas y las composiciones inmunógenas que comprenden dichas proteínas se conocen en la técnica y se describen en por ejemplo el documento WO2003/063766 y en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º: US 20060257413 y US 20090202593.

El término "P2086" se refiere en general a la proteína codificada por ORF2086. La "P" antes de "2086" es una abreviatura de "proteína". Las proteínas P2086 de la invención pueden ser lipidadas o no lipidadas. "LP2086" y "P2086" se refieren normalmente a formas lipidadas y no lipidadas de una proteína 2086, respectivamente. La proteína P2086 de la invención puede ser recombinante. "rLP2086" y "rP2086" se refieren, normalmente, a formas lipidadas y no lipidadas de una proteína 2086 recombinante, respectivamente. "2086" también se conoce como proteína de unión al factor H (fHBP) debido a su capacidad para unirse al factor H.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración a seres humanos u otros huéspedes vertebrados. Normalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable es un vehículo autorizado por una agencia reguladora de un gobierno estatal, un gobierno federal, u otra agencia reguladora o indicada en la Farmacopea de EE.UU. o en otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, incluidos seres humanos así como mamíferos no humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, conservante o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético. Como vehículos líquidos se pueden emplear agua, soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados

incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades menores de agentes humectantes, voluminizadores, emulsionantes o tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, formulaciones de liberación sostenida y similares. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. La formulación deberá adaptarse al modo de administración. El vehículo adecuado será evidente para los expertos en la técnica y dependerá en gran parte de la vía de administración.

Una respuesta inmunológica "protectora" se refiere a la capacidad de una composición inmunógena para provocar una respuesta inmunológica, bien humoral o bien celular, que sirve para proteger al sujeto de una infección. La protección proporcionada no tiene que ser absoluta, es decir, no se tiene que evitar o erradicar totalmente la infección, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población control de sujetos, por ejemplo animales infectados a los que no se ha administrado la vacuna o la composición inmunógena. La protección se puede limitar a mitigar la gravedad o la rapidez del inicio de los síntomas de la infección. En general, una "respuesta inmunitaria protectora" incluiría la inducción de un incremento de los niveles de anticuerpos específicos de un antígeno concreto en al menos el 50 % de los sujetos, incluido algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles a cada antígeno. En situaciones concretas, una "respuesta inmunitaria protectora" podría incluir la inducción de un incremento por dos de los niveles de anticuerpos o un incremento por cuatro de los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno concreto en al menos el 50 % de los sujetos, incluido algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles a cada antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos opsonizantes se correlacionan con una respuesta inmunitaria protectora. Por tanto, la respuesta inmunitaria protectora se puede analizar midiendo la disminución en porcentaje del recuento bacteriano en un ensayo de actividad bactericida en suero (ABS) o un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo como los descritos más adelante. Dichos ensayos también se conocen en la técnica. Por ejemplo, para las vacunas meningocócicas el ensayo de ABS es un sustituto establecido para la protección. En algunas realizaciones existe una disminución del recuento bacteriano de al menos 10 %, 25 %, 50 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más, en comparación con el recuento bacteriano en ausencia de la composición inmunógena.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero de residuos aminoácidos y no están limitados a una longitud mínima del producto. Por tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares están incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están dentro de la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora, pero que pueden ser no conservadoras), en una secuencia nativa, preferentemente tales que la proteína mantiene la capacidad de provocar una respuesta inmunológica dentro de un animal al que se administra la proteína. También se incluyen las modificaciones postexpresión, por ejemplo glucosilación, acetilación, lipidación, fosforilación y similares.

El término "recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína polipéptido o célula que expresa un gen de interés producido por procedimientos de ingeniería genética. El término "recombinante", como se usa con respecto a una proteína o polipéptido quiere decir un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante. Las proteínas de la presente invención se pueden aislar de una fuente natural o producirse mediante procedimientos de ingeniería genética. "Recombinante", como se usa en el presente documento, describe además una molécula de ácido nucleico, que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociada con nada o con una porción del polinucleótido con el que está asociada en la naturaleza. El término "recombinante", como se usa con respecto a una célula huésped quiere decir una célula huésped que incluye un polinucleótido recombinante.

El término "estabilizante" se refiere a un compuesto que se une a un antígeno y mantiene los epítomos o la inmunorreactividad del antígeno durante un periodo de tiempo. Los estabilizantes se conocen en la técnica. Ejemplos de estabilizantes incluyen cationes multivalentes, por ejemplo de calcio o aluminio.

El término "sujeto" se refiere a un mamífero, ave, pez, reptil o cualquier otro animal. El término "sujeto" también incluye seres humanos. El término "sujeto" también incluye mascotas domésticas. Ejemplos no limitantes de mascotas domésticas incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, jerbos, hámsters, cobayas, hurones, aves, serpientes, lagartijas, peces, tortugas y ranas. El término "sujeto" también incluye animales de ganado. Ejemplos no limitantes de animales de ganado incluyen: alpacas, bisontes, camellos, ganado vacuno, ciervos, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, renos, yaks, pollos, gansos y pavos.

El término "mamíferos", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier mamífero, tal como, por ejemplo, seres humanos, ratones, conejos, primates no humanos. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

Los términos "vacuna" o "composición de vacuna", que se usan de forma intercambiable, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunógena que induce una respuesta inmunitaria en un sujeto.

**Descripción general**

La presente invención surge del descubrimiento novedoso de que formulaciones y programas de dosificación concretos de variantes no lipidadas de P2086 producen mayores valoraciones de anticuerpos bactericidas que formulaciones anteriores de P2086, tal como se describe en, por ejemplo, Fletcher y col., *Infection & Immunity*. Vol. 72(4):2088-2100 (2004). Como alternativa, la presente invención surge del descubrimiento novedoso de que formulaciones y programas de dosificación concretos de variantes no lipidadas de P2086 producen mayores valoraciones de anticuerpos bactericidas que las formulaciones disponibles comercialmente de variantes de LP2086 lipidadas. No obstante, cabe destacar que las formulaciones comerciales de LP2086 lipidadas pueden no estar disponibles en la actualidad. Se observaron mayores tasas de respuesta (definida por un incremento de cuatro veces o más de las valoraciones de ABS sobre el valor basal) para la vacuna que contiene la variante de rP2086 no lipidadas en comparación con la vacuna de rLP2086 lipidadas. La formulación de la variante de P2086 no lipidadas produjo anticuerpos bactericidas contra un espectro más amplio de cepas, incluidas las cepas con secuencias tanto similares (ID > 92 %) como diferentes (ID < 92 %) de LP2086.

La presente invención también identifica dificultades previamente no identificadas que expresan variantes de P2086 no lipidadas y proporciona procedimientos para superar estas dificultades y composiciones novedosas de las mismas. Aunque construcciones de plásmidos que codifican variantes de P2086 no lipidadas proporcionaban expresión fuerte de las variantes no lipidadas, estas variantes estaban piruviladas en la Cys N-terminal. La piruvilación previene o reduce la probabilidad de fabricar consistencia o uniformidad de los polipéptidos. Los inventores descubrieron además que la delección de la Cys N-terminal de las secuencias variantes de P2086 no lipidadas evitaba la piruvilación de las variantes de P2086 no lipidadas. Los intentos de superar la piruvilación mediante delección del codón para la Cys N-terminal anularon la expresión o dieron como resultado la expresión de variantes insolubles. Como alternativa, la eliminación de la Cys N-terminal de las variantes de P2086 no lipidadas disminuyó la expresión en algunas variantes. No obstante, sorprendentemente, los inventores descubrieron que al menos las variantes A05, B01, B09 y B44 no lipidadas no piruviladas se pueden expresar a pesar de la delección del residuo de Cys en N-terminal. En general, estos polipéptidos se podían expresar sin modificaciones adicionales aparte de la delección de Cys, en comparación con la correspondiente secuencia no lipidadas de tipo silvestre. Véanse, por ejemplo, los ejemplos 2 y 4. Además, los inventores descubrieron que las variantes no lipidadas no piruviladas eran sorprendentemente inmunógenas e inesperadamente producían anticuerpos bactericidas.

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación proporciona dos procedimientos para superar o reducir la probabilidad de estas dificultades a la hora de expresar variantes no lipidadas. No obstante, en la presente divulgación se contemplan procedimientos adicionales. El primer procedimiento era variar la longitud del tallo de Gly/Ser en la cola N-terminal inmediatamente aguas abajo de la Cys N-terminal. El segundo procedimiento era la optimización por codón dentro de la cola N-terminal. No obstante, en la presente divulgación se contempla la optimización de codones adicionales. Estos procedimientos proporcionan expresión potenciada de las variantes de P2086 no lipidadas solubles. Por ejemplo, en una realización, la expresión potenciada de las variantes de P2086 no lipidadas solubles se compara con la expresión de las variantes no lipidadas de tipo silvestre correspondientes.

**Polipéptidos aislados**

Sorprendentemente, los inventores han descubierto polipéptidos de ORF2086 no lipidados, no piruvilados aislados. Los inventores han descubierto además que los polipéptidos son, inesperadamente, inmunógenos y capaces de producir una respuesta inmunitaria bactericida.

Como se usa en el presente documento, el término "no piruvilado" se refiere a un polipéptido que no tiene contenido de piruvato. Los polipéptidos de ORF2086 no lipidados que tienen un contenido de piruvato normalmente exhibían un desplazamiento de la masa de +70, en comparación con el correspondiente polipéptido de tipo silvestre. En una realización, el polipéptido de la invención no exhibe un desplazamiento de la masa de +70 en comparación con el correspondiente polipéptido no lipidado de tipo silvestre cuando se mide mediante espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 10.

En otra realización, el polipéptido de ORF2086 no lipidado, no piruvilado, aislado incluye una delección de un residuo de cisteína N-terminal en comparación con el correspondiente polipéptido de ORF2086 no lipidado de tipo silvestre. El término "cisteína en N-terminal" se refiere a una cisteína (Cys) en el extremo N-terminal o en la cola N-terminal de un polipéptido. Más específicamente, "cisteína en N-terminal", como se usa en el presente documento, se refiere a una cisteína en el extremo N-terminal en la que están lipidadas las lipoproteínas LP2086 con una cola del lípido tripalmitoilo, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, cuando se hace referencia a una cualquiera de las SEC ID N.ºs: 12-21 como secuencia de referencia, la cisteína en N-terminal está localizada en la posición 1.

La expresión "polipéptido de ORF2086 no lipidado de tipo silvestre" o "polipéptido de 2086 no lipidado de tipo silvestre" o "polipéptido no lipidado de tipo silvestre" se refiere a un polipéptido de ORF2086 que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ORF2086 lipidado maduro correspondiente que se encuentra en la naturaleza. La única diferencia entre las moléculas no lipidadas y lipidadas es que el polipéptido de ORF2086 no lipidado de tipo silvestre no está lipidado con una cola del lípido tripalmitoilo en la cisteína en N-terminal.

Como se conoce en la técnica, la forma 2086 no lipídada se produce mediante una proteína que carece de la secuencia líder original o mediante una secuencia líder que está sustituida con una porción de secuencia que no especifica un sitio para la acilación de ácidos grasos en una célula huésped. Véase, por ejemplo, el documento WO2003/063766.

5 Ejemplos de ORF2086 no lipídados incluyen no solo un polipéptido ORF2086 no lipídado de tipo silvestre recién descrito sino también polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEC ID N.<sup>os</sup>: 12-21 en las que la cisteína en N-terminal está delecionada y los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de SEC ID N.<sup>os</sup>: 12-21 en las que la cisteína en N-terminal está sustituida. Ejemplos adicionales de un polipéptido de ORF2086 no lipídado incluyen secuencias aminoacídicas  
10 seleccionadas de SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 64.

Ejemplos de un polipéptido ORF2086 no lipídado de tipo silvestre incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de SEC ID N.<sup>os</sup>: 12-21, mostradas en la Figura 2, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60. Estos polipéptidos de ORF2086 no lipídados de tipo silvestre incluyen una Cys en N-  
15 terminal.

Como se usa en el presente documento, por ejemplo, un polipéptido B44 “no lipídado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 21 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está delecionada y SEQ ID NO: 44. Un polipéptido B44 “no lipídado de tipo silvestre” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21. Un polipéptido B44 “no lipídado no piruvilado”  
20 incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 21 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está delecionada y SEQ ID NO: 44.

Como otro ejemplo, como se usa en el presente documento, un polipéptido B09 “no lipídado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 18 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está delecionada, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50. Un polipéptido B09 “no lipídado de tipo silvestre” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18. Un polipéptido B09 “no lipídado no piruvilado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está delecionada, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.  
25

Como otro ejemplo adicional, como se usa en el presente documento, un polipéptido A05 “no lipídado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 13 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está delecionada y SEQ ID NO: 55. Un polipéptido A05 “no lipídado de tipo silvestre” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 13. Un polipéptido A05 “no lipídado no piruvilado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 13 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está delecionada y SEQ ID NO: 55.  
30

El término “deleción” de la Cys en N-terminal como se usa en el presente documento incluye una mutación que deleciona la Cys en N-terminal, en comparación con una secuencia polipeptídica no lipídada de tipo silvestre. Por ejemplo, una “deleción” de la Cys en N-terminal se refiere a una eliminación del aminoácido Cys a partir de una secuencia de referencia, por ejemplo, a partir de la secuencia de tipo silvestre correspondiente, dando como resultado de este modo un decrecimiento de un residuo aminoacídico según se compara con la secuencia de referencia.  
35

En otra realización, la Cys en N-terminal está sustituida por un aminoácido que no es un residuo de Cys. Por ejemplo, en una realización ejemplar, la Cys N-terminal en la posición 1 de SEC ID N.<sup>os</sup>: 12-21 incluye una sustitución C→G en la posición 1. Véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 62 según se compara con SEQ ID NO: 19 (tipo silvestre de B22) y SEQ ID NO: 64 según se compara con SEQ ID NO: 15 (tipo silvestre de A22). Los aminoácidos de ejemplo para reemplazar la Cys en N-terminal incluyen cualquier aminoácido que no sea Cys, preferentemente un aminoácido no cargado polar tal como, por ejemplo, glicina. En una realización preferida, la sustitución se hace con residuo no conservador para Cys.  
40 45

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que la expresión de polipéptidos de ORF2086 no lipídados que tienen una deleción de un residuo de Cys en N-terminal tuvo como resultado una piruvilación no detectable cuando se midió mediante espectrometría de masas, en comparación con el correspondiente polipéptido de ORF2086 no lipídado de tipo silvestre. Ejemplos de polipéptidos de ORF2086 no lipídados no piruvilados incluyen los que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12 (A04), SEQ ID NO: 13 (A05), SEQ ID NO: 14 (A12), SEQ ID NO: 15 (A22), SEQ ID NO: 16 (B02), SEQ ID NO: 17 (B03), SEQ ID NO: 18 (B09), SEQ ID NO: 19 (B22), SEQ ID NO: 20 (B24) y la SEQ ID NO: 21 (B44), en las que la cisteína en la posición 1 está delecionada. Ejemplos adicionales de polipéptidos de ORF2086 no lipídados no piruvilados aislados incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 55. Preferentemente, el polipéptido 2086 no lipídado no piruvilado incluye al menos aproximadamente 250, 255, o 260 aminoácidos consecutivos y como máximo, aproximadamente 270, 269, 268, 267, 266, 265, 264, 263, 260, 259, 258, 257, 256 o 255 aminoácidos consecutivos. Cualquier valor mínimo se puede combinar con un valor máximo para definir un intervalo. Más preferentemente, el  
50 55

polipéptido tiene al menos 254 o 262 aminoácidos consecutivos.

En una realización, el polipéptido de ORF2086 no lipidado no piruvilado aislado está codificado por una secuencia nucleotídica que está operativamente unida a un sistema de expresión, en el que el sistema de expresión se puede expresar en una célula bacteriana. En una realización de ejemplo, la secuencia de nucleótidos está unida a una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia nucleotídica.

En la técnica se conocen sistemas de expresión adecuados, secuencias reguladoras y células bacterianas. Por ejemplo, se puede usar cualquier vector de expresión plasmídico, por ejemplo, PET™ (Novogen, Madison Wis.) o PMAL™ (New England Biolabs, Beverly, Mass.), siempre que el polipéptido pueda expresarse en una célula bacteriana. Preferentemente, se usa el vector PET™ para clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* en el sistema PET™, el gen clonado se puede expresar sometido al control de un promotor del fago T7. Células bacterianas de ejemplo incluyen *Pseudomonas fluorescens* y preferentemente, *E. coli*.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de ORF2086 no lipidado no piruvilado que se puede obtener mediante un procedimiento. Preferentemente el polipéptido está aislado. La invención se refiere además a composiciones que incluyen un polipéptido de ORF2086 no lipidado no piruvilado que se puede obtener mediante un procedimiento. Preferentemente la composición es una composición inmunógena. El procedimiento incluye expresar una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19, en el que la cisteína en la posición 1 está delecionada. La secuencia nucleotídica que está operativamente unida a un sistema de expresión que se puede expresar en una célula bacteriana. En una realización, el procedimiento incluye expresar una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 55. En otra realización, la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 51, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 54. Preferentemente, la célula bacteriana es *E. coli*.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición que incluye un primer polipéptido aislado, que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 49 y un segundo polipéptido aislado, que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 44. En una realización preferida, los polipéptidos son inmunógenos. En otra realización preferida, la composición incluye además un polipéptido de ORF2086 de la subfamilia A de *N. meningitidis* del serogrupo B. Preferentemente, el polipéptido de ORF2086 de la subfamilia A es un polipéptido de ORF2086 de la subfamilia A no piruvilado y no lipidado. En una realización de ejemplo, el polipéptido de ORF2086 de la subfamilia A es A05, ejemplos del cual incluyen, por ejemplo, la SEQ ID NO: 13, en la que la cisteína en N-terminal en la posición 1 está delecionada y la SEQ ID NO: 55.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un polipéptido aislado. El procedimiento incluye expresar en una célula bacteriana un polipéptido, que incluye una secuencia que tiene una identidad superior al 90 % con la SEC ID N 21, incluyendo dicha secuencia al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 13-18 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 21-34 de SEQ ID NO: 21 y los aminoácidos 70-80 de SEQ ID NO: 21 o una combinación de los mismos, en el que la secuencia carece de una cisteína en N-terminal. El procedimiento incluye además purificar el polipéptido. El polipéptido producido en este procedimiento incluye un polipéptido de ORF2086 no piruvilado no lipidado. Preferentemente, el polipéptido es inmunógeno. En una realización preferida, la célula bacteriana es *E. coli*.

Ejemplos de polipéptidos que incluyen al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 13-18 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 21-34 de SEQ ID NO: 21 y los aminoácidos 70-80 de SEQ ID NO: 21, o una combinación de los mismos, incluyen la SEQ ID NO: 12 (A04), la SEQ ID NO: 13 (A05), la SEQ ID NO: 14 (A12), la SEQ ID NO: 15 (A22), la SEQ ID NO: 16 (B02), la SEQ ID NO: 17 (B03), la SEQ ID NO: 18 (B09), la SEQ ID NO: 19 (B22), la SEQ ID NO: 20 (B24) y la SEQ ID NO: 21 (B44). Preferentemente la cisteína en la posición 1 de estos polipéptidos está delecionada. Otros ejemplos de polipéptidos incluyen la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 62 y la SEQ ID NO: 64.

En una realización de ejemplo, la secuencia polipeptídica aislada incluye además al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 96-116 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 158-170 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 172-185 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 187-199 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 213-224 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 226-237 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 239-248 de SEQ ID NO: 21 o una combinación de los mismos. Ejemplos de polipéptidos que incluyen al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 13-18 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 21-34 de SEQ ID NO: 21 y los aminoácidos 70-80 de SEQ ID NO: 21, o una combinación de los mismos e incluyen además al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 96-116 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 158-170 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 172-185 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 187-199 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 213-224 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 226-237 de SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 239-248 de SEQ ID NO: 21, o una combinación de las mismas, incluyen la SEQ ID NO: 16 (B02), la SEQ ID NO: 17 (B03), la SEQ ID NO: 18 (B09), la SEQ ID NO: 19 (B22), la SEQ ID NO: 20 (B24) y la SEQ ID NO: 21 (B44). Preferentemente la cisteína en la posición 1 de estos polipéptidos está delecionada. Otros ejemplos de polipéptidos incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ

ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 55 y la SEQ ID NO: 62.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado producido por un procedimiento descrito en el presente documento. En una realización, el polipéptido aislado es un polipéptido no lipidado no piruvilado. En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunógena producida por un procedimiento descrito en el presente documento.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18 en la que la cisteína en N-terminal en la posición 1 está deletada o la SEQ ID NO: 49. Las secuencias nucleotídicas de ejemplo que codifican la SEQ ID NO: 49 incluyen secuencias seleccionadas de la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47 y la SEQ ID NO: 48. Preferentemente, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 46. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que incluye la SEQ ID NO: 46. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que incluye la SEQ ID NO: 47. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que incluye la SEQ ID NO: 48.

En un aspecto, la invención se refiere a un plásmido que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 48 y la SEQ ID NO: 45, en el que el plásmido se puede expresar en una célula bacteriana. En la técnica se conocen sistemas de expresión adecuados, secuencias reguladoras y células bacterianas, como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, la célula bacteriana es *E. coli*.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 50. En una realización de ejemplo, la SEQ ID NO: 50 está codificada por la SEQ ID NO: 45.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, en la que la Cys en N-terminal está deletada o la SEQ ID NO: 44. Las secuencias nucleotídicas de ejemplo que codifican la SEQ ID NO: 44 incluyen secuencias seleccionadas de la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 51. Preferentemente, la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 43. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que incluye la SEQ ID NO: 43.

#### Composiciones inmunógenas

En una realización preferida, las composiciones descritas en el presente documento que incluyen un polipéptido ORF2086 no lipidado no piruvilado aislado son inmunógenas. Las composiciones inmunógenas que incluyen una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria meningitidis* ORF2086 se conocen en la técnica. Las composiciones inmunógenas ejemplares incluyen las descritas en el documento WO2003/063766 y los números de publicaciones de solicitud de patente US 20060257413 y US 20090202593. Tales composiciones inmunógenas descritas aquí incluyen una proteína que muestra actividad bactericida identificada como proteína ORF2086, sus partes inmunógenas, y/o sus equivalentes biológicos. La proteína ORF2086 se refiere a una proteína codificada por un marco abierto de lectura 2086 de *Neisseria* species.

La proteína puede ser una proteína recombinante o una proteína aislada de la especie nativa de *Neisseria*. Por ejemplo, proteínas ORF2086 de *Neisseria* se pueden aislar de cepas bacterianas, tales como las especies de *Neisseria*, que incluyen cepas de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, B, C, D, W-135, X, Y, Z y 29E), *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria lactamica*, así como partes inmunógenas y/o equivalentes biológicos de dichas proteínas.

Las proteínas ORF2086 incluyen proteínas 2086 de la subfamilia A y proteínas de la subfamilia B, sus partes inmunógenas, y/o sus equivalentes biológicos. Las proteínas 2086 de la subfamilia A y las proteínas de la subfamilia B 2086 se conocen en la técnica, véase, por ejemplo Fletcher y col., 2004 citado anteriormente y Murphy y col., J Infect Dis. 1 de agosto de 2009; 200(3):379-89. Véase también el documento WO2003/063766, que divulga las SEC ID N.ºs: 260 a 278 en este documento como representantes de las secuencias de aminoácidos asociadas a las proteínas de la Subfamilia A 2086. Además, se describen en el documento WO2003/063766 las SEC ID N.ºs: 279 a 299 en este documento como representantes de las secuencias de aminoácidos asociadas a las proteínas de la Subfamilia 2086 B. El documento WO2003/063766 se incorpora en el presente documento por referencia. Las proteínas ORF2086 o sus equivalentes, etc. pueden estar lipidadas o no lipidadas. Preferentemente, la proteína ORF2086 de *Neisseria* está no lipidada. De manera alternativa, las composiciones inmunógenas pueden ser combinaciones de proteínas ORF2086 lipidadas y no lipidadas.

En (una) realización, la composición inmunógena de la presente divulgación incluye una proteína aislada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos a una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086.

En una realización, la composición inmunógena de la presente divulgación incluye una proteína aislada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína de la Subfamilia A codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086. Preferentemente, la composición inmunógena incluye una proteína de la Subfamilia A codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086. En algunas realizaciones, el polipéptido de la Subfamilia A ORF2086 es una variante A05, una A04, una A12, o una A22. En algunas realizaciones, el Polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A es una variante A05, una A12, o una A22.



En otra realización, la composición inmunógena de la presente divulgación incluye una proteína aislada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína de la Subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086. Preferiblemente, la composición inmunógena incluye una proteína de la Subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086. En algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la Subfamilia B es una variante B44, una B02, una B03, una B22, una B24 o una B09. En algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la Subfamilia B es una variante B44, una B22, o una B09.

En una realización preferida, la composición inmunógena de la presente divulgación incluye un polipéptido no lipidado no piruvilado aislado que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína de la Subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la Subfamilia B es una B44 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 21; una B02 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 16; una B03 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 17; a B22 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 20; o una variante B09 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:18, en la que la Cys N-terminal está suprimida, o una combinación de las mismas.

Más preferiblemente, la composición inmunógena de la presente divulgación incluye un polipéptido B09 no lipidado no piruvilado, un polipéptido B44 no lipidado no piruvilado, o combinaciones de los mismos. En una realización, la composición incluye una variante B09 no lipitada no piruvilada que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:18, en la que Cys N-terminal está delecionada, una B44 no lipitada no piruvilada que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 21, en la que la Cys N-terminal está delecionada, o una combinación de las mismas. En otra realización, la composición inmunógena incluye una B09 no lipitada no piruvilada que tiene la SEQ ID NO: 49, una B44 no lipitada no piruvilada que tiene SEQ ID NO: 44, o una combinación de las mismas.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición inmunógena que incluye un polipéptido ORF2086 de subfamilia B del serogrupo B de *N. meningitidis*, en el que el polipéptido es un B44 no lipidado no piruvilado. EL B44 puede incluir la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 21, en la que la Cys N-terminal está delecionada o la SEQ ID NO: 44. En una realización, la composición además incluye un segundo polipéptido ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* del serogrupo B, en el que el segundo polipéptido es un B09 no lipidado no piruvilado. El B09 puede incluir la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 18, en la que Cys N-terminal está suprimida, o la SEQ ID NO: 49. En una realización, la composición inmunógena es una vacuna.

En otra realización, la composición incluye no más de 3 polipéptidos ORF2086 de subfamilia B. En una realización adicional, la composición incluye no más de 2 polipéptidos ORF2086 de subfamilia B.

En una realización, la composición incluye además uno o más polipéptidos ORF2086 de subfamilia A. En una realización preferida, la composición incluye un polipéptido A05 de subfamilia A.

En aún otra realización, la composición inmunógena de la presente divulgación incluye una proteína aislada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína de la subfamilia A codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086 y una proteína aislada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína de la Subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086.

Preferiblemente, la composición inmunógena incluye una proteína aislada de la subfamilia A codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086 y una proteína aislada de la Subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086. Más preferiblemente, la composición inmunógena incluye un polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A no lipidado no piruvilado aislado y un polipéptido ORF2086 de la Subfamilia B no lipidado no piruvilado aislado. En algunas realizaciones, el polipéptido ORF2086 de la subfamilia A es una variante A05, una A04, una A12, o una A22. En una realización preferida, el Polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A es un A05 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13; un A04 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 12; un A12 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14; o una variante A22 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15, en la que la Cys N-terminal está delecionada, o cualquiera de sus combinaciones. En algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la Subfamilia B es una variante B44, una B02, una B03, una B22, una B24 o una B09. En una realización preferida, la proteína ORF2086 de la Subfamilia B es una B44 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 21; una B02 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 16; una B03 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 17; una B22 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:19; un B24 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 20; o una variante B09 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:18, en la que la Cys N-terminal está suprimida, o una combinación de las mismas.

En una realización, la composición inmunógena incluye una relación 1:1 de una proteína de la subfamilia A a una

proteína de la Subfamilia B.

En otro aspecto, los polipéptidos aislados y las composiciones descritas en el presente documento inducen una respuesta inmune en un mamífero contra polipéptido ORF2086 de *N. meningitidis* de serogrupo B. Las composiciones tienen la capacidad de inducir los anticuerpos anti meningocócicos bactericidas después de la administración a un mamífero y en realizaciones preferidas pueden inducir anticuerpos que son bactericidas contra cepas con las subfamilias respectivas. Información adicional sobre respuestas bactericidas se proporciona más adelante. Véase, por ejemplo, Ejemplos 6, 11, 12 y 13. Los anticuerpos bactericidas son un indicador de la protección en seres humanos y los estudios preclínicos sirven como un sustituto y cualquier candidata a composición inmunógena nueva debe inducir estos anticuerpos funcionales.

En una realización ejemplar de la presente divulgación, el polipéptido B09 no lipidado no piruvilado que tiene SEQ ID NO: 18 en el que Cys N-terminal en la posición 1 está deletionada o SEQ ID NO: 49 y sus composiciones inmunógenas, induce anticuerpos bactericidas contra (por ejemplo, que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 de *N. meningitidis* de serogrupo B, subfamilia A o preferiblemente subfamilia B. Preferiblemente, el polipéptido B09 no lipidado no piruvilado y sus composiciones inmunógenas, induce los anticuerpos bactericidas contra la variante A05 (SEQ ID NO: 13); variante B44 (SEQ ID NO: 21); variante B16 (SEQ ID NO: 60); variante B24 (SEQ ID NO: 20); variante B09 (SEQ ID NO: 18), o una combinación de las mismas. En una realización ejemplar, el polipéptido no lipidado no piruvilado y composiciones inmunógenas del mismo, inducen los anticuerpos bactericidas contra variante B44 (SEQ ID NO: 21); variante B16 (SEQ ID NO: 60); variante B24 (SEQ ID NO: 20); variante B09 (SEQ ID NO: 18), o una combinación de las mismas. Véanse, por ejemplo, Ejemplo 11, Ejemplo 12 y Ejemplo 13.

En otra realización ejemplar de la presente divulgación, el polipéptido B44 no lipidado no piruvilado que tiene SEQ ID NO: 21 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está deletionada o SEQ ID NO: 44 y sus composiciones inmunógenas, induce anticuerpos bactericidas contra (por ejemplo, que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 de *N. meningitidis* del serogrupo B, subfamilia B. Preferiblemente, el polipéptido B44 no lipidado no piruvilado B44 y sus composiciones inmunógenas, induce los anticuerpos bactericidas contra la variante B44 (SEQ ID NO: 21); variante B16 (SEQ ID NO: 60); variante B24 (SEQ ID NO: 20); variante B09 (SEQ ID NO: 18), o una combinación de las mismas. Véase, por ejemplo, Ejemplo 11. Adicionalmente el polipéptido B44 no lipidado no piruvilado y sus composiciones inmunógenas también pueden inducir anticuerpos bactericidas que se unen a la variante B02 (SEQ ID NO: 16). Véanse, por ejemplo, Ejemplo 12 y Ejemplo 13. Además, el polipéptido B44 no lipidado no piruvilado y sus condiciones inmunógenas también pueden inducir anticuerpos bactericidas que se unen a la variante B03 (SEQ ID NO: 17) y la variante B15 (SEQ ID NO: 59). Véase, por ejemplo, Ejemplo 6.

En una realización ejemplar adicional, el polipéptido B22 no lipidado no piruvilado aislado que tiene SEC I N.º 19 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está deletionada y sus composiciones inmunógenas, induce anticuerpos bactericidas contra (por ejemplo, que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B, subfamilia B. Preferentemente, el polipéptido B22 no lipidado no piruvilado induce anticuerpos bactericidas contra la variante B44 (SEQ ID NO: 21); la variante B16 (SEQ ID NO: 60); la variante B24 (SEQ ID NO: 20); la variante B09 (SEC ID N.º 18) o una combinación de las mismas. Véase, por ejemplo, Ejemplo 13.

En una realización, el polipéptido A05 no lipidado no piruvilado aislado que tiene SEQ ID NO: 13 en la que Cys N-terminal está deletionada o SEQ ID NO: 55 y sus composiciones inmunógenas, induce anticuerpos bactericidas contra (por ejemplo, que se puede unir a) un polipéptido ORF2086 de *N. meningitidis* de serogrupo B, subfamilia A. Preferiblemente, el A05 no lipidado no piruvilado y sus composiciones inmunógenas, inducen anticuerpos bactericidas contra la variante A05 (SEQ ID NO: 13), variante A22 (SEQ ID NO: 15), variante A12 (SEQ ID NO: 14), o una combinación de las mismas. Véase, por ejemplo, Ejemplo 6 y 13.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de inducir anticuerpos bactericidas específicos para *N. meningitidis* de serogrupo B en un mamífero. En una realización ejemplar, el procedimiento incluye anticuerpos que inducen bactericidas específicos para un ORF2086 de *N. meningitidis* de serogrupo B de subfamilia B, ORF2086 de *N. meningitidis* de serogrupo B de subfamilia A, o una combinación de los mismos. El procedimiento incluye la administración al mamífero de una cantidad eficaz de un polipéptido 2086 no lipidado no piruvilado o composición inmunógena del mismo, como se ha descrito anteriormente.

En una realización preferida de la presente divulgación, el procedimiento incluye la inducción de anticuerpos bactericidas específicos para un ORF2086 de *N. meningitidis* de serogrupo B de subfamilia B. El polipéptido aislado o composición inmunógena incluye un polipéptido B4 no lipidado no piruvilado. En otra realización preferida, la composición además incluye un polipéptido no piruvilado no lipidado B09. En una realización ejemplar el polipéptido aislado o composición inmunógena incluye SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 44, o una combinación de los mismos. En una realización preferida, el polipéptido aislado o composición inmunógena incluye SEQ ID NO: 18, en la que la Cys en N-terminal en la posición 1 está deletionada, SEQ ID NO: 21, en la que la Cys en N-terminal en la posición 1 está deletionada, o una combinación de las mismas. En todavía otra realización preferida, el polipéptido aislado o composición inmunógena incluye SEQ ID NO: 19, en la que la Cys en N-terminal en la posición 1 está deletionada.

En una realización preferida de la presente divulgación, el procedimiento incluye la inducción de anticuerpos

bactericidas específicos para un ORF2086 de *N. meningitidis* de serogrupo B de subfamilia A. El polipéptido aislado o composición inmunógena incluye un polipéptido A05 no lipidado no piruvilado. En una realización preferida, el polipéptido aislado o composición inmunógena incluye SEQ ID NO: 13, en el que la Cys N-terminal en la posición 1 está deletada. En otra realización preferida, la composición además incluye un polipéptido B44 no lipidado no piruvilado. Veáanse, por ejemplo, ejemplo 6 y 13. En una realización ejemplar, el polipéptido aislado o composición inmunógena incluye la SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 44, o una combinación de las mismas. En una realización preferida, el polipéptido aislado o composición inmunógena incluye SEQ ID NO: 13, en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, SEQ ID NO: 21, en la que Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida una combinación de las mismas.

La composición inmunógena puede incluir una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos de polinucleótidos ORF2086 de *Neisseria*, o sus equivalentes como el único inmunógeno activo en la composición inmunógena. De manera alternativa, la composición inmunógena puede además incluir inmunógenos activos, incluyendo otros polipéptidos inmunógenos de *Neisseria sp.*, o proteínas inmunológicamente activas de uno o más patógenos diferentes microbianos (por ejemplo, virus, prion, bacteria, u hongo, sin limitación) o polisacárido capsular. Las composiciones pueden comprender una o más proteínas, fragmentos o compuestos farmacéuticos deseados según se desee para la indicación elegida.

Cualquier multi-antígeno o composición inmunógena multi-valente está contemplado por la presente divulgación. Por ejemplo, la composición inmunógena puede incluir combinaciones de dos o más proteínas ORF2086, una combinación de proteína ORF2086 con una o más proteínas Por A, una combinación de proteína ORF2086 con polisacáridos y/o conjugados de polisacáridos C, Y y W135 de meningococos de serogrupo A, una combinación de proteína ORF2086 con combinaciones de meningococos y neumococos, o una combinación de cualquiera de los anteriores en una forma adecuada para una administración deseada, por ejemplo, para distribución mucosal. Los expertos en la técnica serán capaces fácilmente de formular tales composiciones inmunológicas multi-antígeno o multi-valentes.

La presente invención también contempla regímenes multi-inmunización en los que cualquier composición útil contra un patógeno se puede combinar en ella o con las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, sin limitación, a un paciente se le puede administrar la composición inmunógena de la presente invención y otra composición inmunológica para inmunizar contra el virus papilomavirus humano (HPV), tal como la vacuna HPV GARDASIL®, como parte de un régimen de multi-inmunización. Los expertos en la técnica serían capaces fácilmente de seleccionar composiciones inmunógenas para uso junto con composiciones inmunógenas de la presente invención con el propósito de desarrollar e implementar regímenes de multi-inmunización.

Los polipéptidos ORF2086, fragmentos y equivalentes se pueden usar como parte de una composición inmunógena conjugada; en la que una o más proteínas o polipéptidos se conjugan con un vehículo con el fin de generar una composición que tiene propiedades inmunógenas contra varios serotipos, o más exactamente, serogrupos de *N. meningitidis*, específicamente serogrupos de meningococos y/o contra varias enfermedades. De manera alternativa, uno de los polipéptidos ORF2086 se puede usar como una proteína vehículo para otros polipéptidos inmunógenos. La formulación de tales composiciones inmunógenas se conoce bien por los expertos en la técnica.

Las composiciones inmunógenas de la invención preferiblemente incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cualquiera y todos los disolventes convencionales, medios de dispersión, cargas, vehículos sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como sus combinaciones.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden además incluir cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o eficacia del anticuerpo. La preparación y uso de los vehículos farmacéuticamente aceptables se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en que el medio convencional o el agente sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones inmunógenas de la presente invención.

Composiciones inmunógenas se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por inyección, o bien por vía subcutánea o intramuscular, así como por vía oral o intranasal. Procedimientos para la inmunización intramuscular se describen por Wolff y col. *Biotechniques*;11 (4): 474 - 85, (1991) y por Sedegah y col. *PNAS* Vol. 91, p. 9866 - 9870, (1994). Otros modos de administración emplean formulaciones orales, formulaciones pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas, por ejemplo, sin limitación. Las formulaciones orales, por ejemplo, incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares, sin limitación. Preferiblemente, la composición inmunógena se administra por vía intramuscular.

Las composiciones inmunógenas de la presente invención pueden además comprender uno o más "inmunomoduladores" adicionales, que son agentes que perturban o alteran el sistema inmune, de manera que se observa bien la regulación hacia arriba o bien regulación hacia abajo de la inmunidad humoral y/o mediada por

células. En una realización particular, se prefiere la regulación hacia arriba de los brazos humoral y/o mediado por células del sistema inmune. Ejemplos de ciertos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o citocina, o ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), descrito en la patente de Estados Unidos N.º: 5.254.339 entre otros.

- 5 Ejemplos no limitantes de adyuvantes que se pueden usar en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tal como, por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund, copolímero de bloque (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, monofosforil lípido A y adyuvante lípido Avridina -amina. Los ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua  
10 útiles en la vacuna de la invención incluyen formulaciones modificadas de SEAM62 y SEAM 1/2. SEAM62 modificada es una emulsión de aceite en agua que contiene escualeno al 5 % (v/v) (Sigma), (v/v) detergente SPAN® 85 al 1 % (v/v) (ICI Surfactants), detergente polisorbato ® 80 al 0,7 % (ICI Tensioactivos), etanol al 2,5 % (v/v), 200 µg/ml de Quil A, 100 µg/ml de colesterol y lecitina al 0,5 % (v/v). SEAM 1/2 modificado es una emulsión de aceite en  
15 agua que comprende escualeno al 5 % (v/v), detergente SPAN® 85 al 1 % (v/v), detergente polisorbato ® 80 al 0,7 % (v/v), etanol al 2,5 % (v/v), 100 µg/ml de Quil A y 50 µg/ml de colesterol.

Otros "inmunomoduladores" que se pueden incluir en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones, u otras citocinas o quimiocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de  
20 ciclodextrina o un polímero polianiónico, tal como los descritos en las Patentes de Estados Unidos números 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente. Se ha de entender que el inmunomodulador y/o adyuvante a usar dependerá del sujeto al que la vacuna o composición inmunógena se administrará, de la vía de inyección y del número de inyecciones a proporcionar.

En algunas realizaciones, el adyuvante es saponina. En algunas realizaciones, la concentración de saponina está  
25 entre 1 µg/ml y 250 µg/ml; entre 5 µg/ml y 150 µg/ml; o entre 10 µg/ml y 100 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina es aproximadamente 1 µg/ml; aproximadamente 5 µg/ml; aproximadamente 10 µg/ml; aproximadamente 20 µg/ml; aproximadamente 30 µg/ml; aproximadamente 40 µg/ml; aproximadamente 50 µg/ml; aproximadamente 60 µg/ml; aproximadamente 70 µg/ml; aproximadamente 80 µg/ml; aproximadamente 90 µg/ml; aproximadamente 100 µg/ml; aproximadamente 110 µg/ml; aproximadamente 120 µg/ml; aproximadamente 130 µg/ml; aproximadamente 140 µg/ml; aproximadamente 150 µg/ml; aproximadamente 160 µg/ml; aproximadamente  
30 170 µg/ml; aproximadamente 180 µg/ml; aproximadamente 190 µg/ml; aproximadamente 200 µg/ml; aproximadamente 210 µg/ml; aproximadamente 220 µg/ml; aproximadamente 230 µg/ml; aproximadamente 240 µg/ml; o aproximadamente 250 µg/ml.

En ciertas realizaciones preferidas, las proteínas de esta invención se usan en una composición inmunógena para la  
35 administración oral que incluye un adyuvante mucosal y se usa para el tratamiento o prevención de infección por *N. meningitidis* en un huésped humano. El adyuvante mucosal puede ser una toxina de cólera; sin embargo, preferiblemente, adyuvantes mucosales diferentes de la toxina de cólera que se puede usar de acuerdo con la presente invención incluyen derivados no tóxicos de una holotoxina de cólera, en la que la subunidad A es toxina de cólera mutagenizada, modificada químicamente, o proteínas relacionadas producidas por modificación de la secuencia de aminoácidos de la toxina de cólera. Para una toxina de cólera específica que puede ser  
40 particularmente útil en la preparación de composiciones inmunógenas de esta invención, véase la holotoxina de cólera mutante E29H, como se describe en la Solicitud Internacional Publicada WO 00/18434, que se incorpora por la presente en este documento en su totalidad. Estas se pueden añadir a, o conjugar con, los polipéptidos de esta invención. Se pueden aplicar las mismas técnicas a otras moléculas con adyuvante mucosal o propiedades de administración tales como toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT).

45 Otros compuestos con adyuvante mucosal o actividad de administración se pueden usar tales como bilis; policaciones tales como DEAE-dextrano y poliornitina; detergentes tales como dodecil benceno sulfato de sodio; materiales conjugados de lípidos; antibióticos tales como estreptomina; vitamina A; y otros compuestos que alteran la integridad estructural o funcional de las superficies mucosales. También se pueden usar otros compuestos mucosalmente activos que incluyen derivados de estructuras microbianas tales como MDP; acridina y cimetidina.  
50 STIMULON™ QS-21, MPL e IL-12, como se ha descrito anteriormente.

Las composiciones inmunógenas de esta invención se pueden administrar en la forma de ISCOMS (complejos estimuladores inmunes), ISCOMS que contienen CTB, liposomas o encapsulados en compuestos tales como acrilatos o poli(DL-lactida-co-glucósido) para formar microesferas de un tamaño adecuado a la adsorción. Las proteínas de esta invención también se pueden incorporar en emulsiones oleosas.

55 Una cantidad (es decir, dosis) de composición inmunógena que se administra al paciente se puede determinar de acuerdo con técnicas convencionales para los expertos en la técnica, teniendo en consideración factores tales como el antígeno particular, el adyuvante (si está presente), la edad, sexo, peso, especie, condición del paciente particular y la vía de administración.

Por ejemplo, una dosificación para un paciente adolescente humano puede incluir al menos 0,1 µg, 1 µg, 10 µg, o 50

µg de una proteína ORF2086 de *Neisseria* y al menos 80 µg, 100 µg, 150 µg, o 200 µg de una proteína ORF2086 de *Neisseria*. Cualquier valor mínimo y cualquier valor máximo se puede combinar para definir un intervalo adecuado.

#### Adyuvantes

5 Composiciones inmunógenas como se describen en el presente documento comprenden, en ciertas realizaciones, uno o más adyuvantes. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmune cuando se administra conjuntamente con un inmunógeno o antígeno. Se ha mostrado que un número de citocinas o linfocinas tienen actividad moduladora inmune y de este modo son útiles como adyuvantes, incluyendo, pero sin limitación, las interleucinas 1- $\alpha$ , 1- $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, *por ejemplo*, Patente de Estados Unidos Número: 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factor estimulante de la colonia de macrófagos - granulocitos (GM-CSF) (véase, *por ejemplo*, Patente de Estados Unidos N.º: 5.078.996 y Número de acceso de ATCC 39900); factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF); factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF); y los factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ .

15 Aún otros adyuvantes que son útiles con las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento incluyen quimiocinas, incluyendo sin limitación, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES; moléculas de adhesión, tales como una selectina, *por ejemplo*, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas del tipo mucina, *por ejemplo*, CD34, GliCAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas tal como PECAM, ICAM, *por ejemplo*, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras tales como B7-1, B7-2, CD40 y CD40L; factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, PDGF, BL-1 y factor de crecimiento vascular endotelial; moléculas receptoras que incluyen Fas, receptor TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6; y Caspasa (ICE).

20 Otros adyuvantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a hidróxido de aluminio; fosfato de aluminio; STIMULON™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass.); MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, Mont.), 529 (un compuesto amino alquil glucosamina fosfato, Corixa, Hamilton, Mont.), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.); GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, Wash.); N-acetil-muramil-L-teronil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominada como nor-MDP); N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi-etilamina) (CGP 19835A, denominada MTP-PE); y toxina de cólera. En ciertas realizaciones preferidas, el adyuvante es QS-21.

30 Los adyuvantes ejemplares adicionales incluyen derivados no tóxicos de la toxina de cólera, incluyendo su subunidad A, y/o conjugados o fusiones modificadas por ingeniería genética del polipéptido de *N. meningitidis* con toxina de cólera o su subunidad B ("CTB"), procoleragenoide, polisacáridos fúngicos, incluyendo esquizofilano, muramil dipéptido, derivados de muramil dipéptido ("MDP"), ésteres de forbol, la toxina termolábil de *E. coli*, polímeros de bloque o saponinas.

35 Se ha usado fosfato de aluminio como adyuvante en un ensayo clínico de fase 1 hasta una concentración de 0,125 mg/dosis, mucho menor que el límite de 0,85 mg/dosis especificado por el Código de Estados Unidos de las Regulaciones Federales [610.15(a)]. Los adyuvantes que contienen aluminio se usan ampliamente en seres humanos para potenciar la respuesta inmune de antígenos cuando se administran por vía intramuscular o subcutánea. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunógena está entre 0,125 µg/ml y 0,5 µg/ml; entre 0,20 µg/ml y 0,40 µg/ml; o entre 0,20 µg/ml y 0,30 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunógena es aproximadamente 0,125 µg/ml; aproximadamente 0,15 µg/ml; aproximadamente 0,175 µg/ml; aproximadamente 0,20 µg/ml; aproximadamente 0,225 µg/ml; aproximadamente 0,25 µg/ml; aproximadamente 0,275 µg/ml; aproximadamente 0,30 µg/ml; aproximadamente 0,325 µg/ml; aproximadamente 0,35 µg/ml; aproximadamente 0,375 µg/ml; aproximadamente 0,40 µg/ml; aproximadamente 0,425 µg/ml; aproximadamente 0,45 µg/ml; aproximadamente 0,475 µg/ml; o aproximadamente 0,50 µg/ml.

40 En una realización preferida, la concentración de aluminio en la composición inmunógena está entre 0,125 µg/ml y 0,5 µg/ml; entre 0,20 µg/ml y 0,40 µg/ml; o entre 0,20 µg/ml y 0,30 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunógena es aproximadamente 0,125 µg/ml; aproximadamente 0,15 µg/ml; aproximadamente 0,175 µg/ml; aproximadamente 0,20 µg/ml; aproximadamente 0,225 µg/ml; aproximadamente 0,25 µg/ml; aproximadamente 0,275 µg/ml; aproximadamente 0,30 µg/ml; aproximadamente 0,325 µg/ml; aproximadamente 0,35 µg/ml; aproximadamente 0,375 µg/ml; aproximadamente 0,40 µg/ml; aproximadamente 0,425 µg/ml; aproximadamente 0,45 µg/ml; aproximadamente 0,475 µg/ml; o aproximadamente 0,50 µg/ml.

55 Los adyuvantes adecuados usados para potenciar una respuesta inmune incluyen además, sin limitación, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado, Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la patente de Estados Unidos N.º: 4.912.094. También adecuados para uso como adyuvantes son análogos sintéticos de lípido A compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o sus derivados o análogos, que están disponibles de Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la patente de Estados Unidos N.º: 6.113.918. Tal AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-

2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glu-copiranosido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (AF) o como una emulsión estable (SE).

5 Además, otros adyuvantes incluyen muramil péptidos, tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforil-oxi)-etilamina (MTP-PE); emulsiones aceite en agua, tales como MF59 (Patente de Estados Unidos N.º: 6.299.884) (que contiene 5 % de Escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,5 % de Span 85 (que opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador tal como microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA)) y SAF (que contiene 10 % de Escualeno, 0,4 % de polisorbato 80, 5 % de polímero bloqueado por plurónico L121 y thr-MDP, bien microfluidificados en una emulsión de partículas submicrométricas o bien agitados en aparato de vórtex para generar una emulsión de tamaño de partículas mayor); adyuvante incompleto de Freund (IFA); sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; Anfígeno; Avridina; L121/escualeno; D-lactida-poliláctido/glucósido; polioles plurónicos; *Bordetella* muerta; saponinas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descritas en la Patente de Estados Unidos N.º: 5.057.540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), descritas en la Patente de Estados Unidos N.º: 5.254.339 y complejos inmunoestimulantes (ISCOMATRIX); *Mycobacterium tuberculosis*; lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º: 6.207.646); IC-31 (Intercell AG, Viena, Austria), descritos en las Patentes Europeas números 1.296.713 y 1.326.634; una toxina pertúsica (PT) o mutante de la misma, una toxina de cólera o mutante de la misma (por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos números 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o una toxina termolábil de *E. coli* (LT) o su mutante, particularmente LT-K63, LT-R72 (por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos números 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

#### Procedimientos de producción de antígenos no lipidados P2086

25 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de producción de un polipéptido ORF2086 no piruvilado no lipidado. El procedimiento incluye la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ORF2086 en el que la cisteína N-terminal está delecionada según se compara con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre correspondiente y en el que la secuencia de nucleótidos está unida de manera operativa a un sistema de expresión que es capaz de expresarse en una célula bacteriana. Polisacáridos ejemplares producidos por el procedimiento incluyen cualquier polipéptido descrito en el presente documento. Por ejemplo, preferiblemente, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 12; la SEQ ID NO: 13; la SEQ ID NO: 14; la SEQ ID NO: 15; la SEQ ID NO: 16; la SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; la SEQ ID NO: 19; la SEQ ID NO: 20; la SEQ ID NO: 21, en el que la cisteína en la posición 1 está delecionada, según se compara con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre correspondiente. Polipeptidos adicionales ejemplares incluyen un polipéptido que tiene las secuencias de aminoácidos ejemplares seleccionadas de SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 64. El procedimiento incluye adicionalmente purificar el polipéptido.

40 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un procedimiento para producir antígenos P2086 solubles no lipidados que comprende las etapas de clonación de la secuencia de ácidos nucleicos de la variante de ORF2086 en un vector de expresión de *E. coli* sin una secuencia de lipidación de control, que transforma las bacterias *E. coli* con el vector de expresión de ORF2086, que induce la expresión y aislamiento de la proteína P2086 expresada. En algunas realizaciones, la expresión se induce con IPTG.

45 En algunas realizaciones, el codón para la Cys N-terminal de la variante ORF2086 está delecionada. Ejemplos de tales codones incluyen TGC. En algunas realizaciones, el codón para la Cys N-terminal de la variante ORF2086 se muta mediante mutagénesis puntual para generar un codón de Ala, Gly, o Val. En algunas realizaciones, los codones Ser y Gly se añaden a la cola N-terminal de la variante ORF2086 para extender el tallo Gly/Ser inmediatamente aguas abajo de la Cys N-terminal. En algunas realizaciones, el número total de restos Gly y Ser dentro del tallo Gly/Ser es al menos 7, 8, 9, 10, 11, o 12. En algunas realizaciones, el codón para la Cys N-terminal está suprimido. En algunas realizaciones, los restos N-terminales 7, 8, 9, 10, 11, o 12 son bien Gly o bien Ser.

50 En algunas realizaciones, los codones de la cola N-terminal de la variante de ORF2086 no lipitada se optimizan mediante mutagénesis puntual. En algunas realizaciones, la cola N-terminal de la variante de ORF2086 no lipitada se optimiza para estar pareja con la cola N-terminal de la variante B09. En algunas realizaciones, los codones de la cola N-terminal de la variante ORF2086 se optimizan mediante mutagénesis puntual tal que el codón que codifica el quinto aminoácido de la variante ORF2086 es 100 % idéntico a los nucleótidos 13-15 de la SEQ ID NO: 8 y el codón que codifica el decimotercero aminoácido de la variante ORF2086 es 100 % idéntico a los nucleótidos 37 - 39 de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la cola N-terminal de la variante no lipitada de ORF2086 se optimiza de manera que los 45 ácidos nucleicos en 5' son 100 % idénticos a los ácidos nucleicos 1-45 de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la cola N-terminal de la variante no lipitada de ORF2086 se optimiza de manera que los 39 ácidos nucleicos 5' son 100 % idénticos a los ácidos nucleicos 4-42 de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la cola N-terminal de la variante no lipitada de ORF2086 se optimiza de manera que los 39 ácidos nucleicos en 5' son 100 % idénticos a los ácidos nucleicos 4-42 de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la cola N-terminal de la variante no lipitada de P2086 comprende al menos una sustitución de aminoácido comparada con los aminoácidos

1 - 15 de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la cola N-terminal de la variante no lipídada de P2086 comprende dos sustituciones de aminoácidos comparado con los aminoácidos 1-15 de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la cola N-terminal de la variante no lipídada de P2086 comprende al menos una sustitución de aminoácidos comparada con los aminoácidos 2 - 15 de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la cola N-terminal de la variante no lipídada de P2086 comprende dos sustituciones de aminoácidos comparada con los aminoácidos 2-15 de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En algunas realizaciones, los codones de la variante no lipídada se han optimizado para incrementar la expresión. La optimización de codón se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sastalla y col., Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75(7): 2099 - 2110 (2009) y *Coleman y col., Science*, vol. 320: 1784 (2008). En algunas realizaciones, la optimización de codón incluye el emparejamiento de la utilización de una secuencia de aminoácidos con la frecuencia de codón del organismo huésped elegido aunque se incluyen y/o excluyen secuencias de ADN específicas. En algunas realizaciones, la optimización de codón además incluye la minimización de la estructura de de ARNm secundaria correspondiente para reducir los impedimentos de traducción. En algunas realizaciones, la cola N-terminal se ha optimizado por codón para que comprenda cualquiera de las SEQ ID NO: 28, 30, 32 y 34. En algunas realizaciones, el tallo Gly/Ser se ha optimizado por codón para que comprenda cualquiera de las SEQ ID NO: 28, 30, 32 y 34.

Con el fin de que esta invención se pueda entender mejor, se establecen los siguientes ejemplos. Los ejemplos son solamente para el propósito de ilustración y no se consideran como limitantes del alcance de la invención.

#### 20 Formulaciones de composiciones inmunógenas

En determinadas realizaciones, las composiciones inmunógenas de la invención comprenden además al menos uno de un coadyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación de radicales libres, un diluyente o un vehículo.

Las composiciones inmunógenas de la invención pueden comprender además uno o más conservantes además de una pluralidad de antígenos de proteínas meningocócicos y conjugados de proteínas con polisacáridos capsulares. La FDA requiere que los productos biológicos en viales de dosis múltiple (multidosis) contengan un conservante, solo con unas pocas excepciones. Los productos de vacuna que contienen conservantes incluyen vacunas que contienen cloruro de bencetonio (ántrax), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (Pneumo, Typhoid (parenteral), Vaccinia) y timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabia). Los conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenoxietanol, cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, timerosal y nitrato de fenilmercurio.

Las formulaciones de la invención pueden comprender además uno o más de un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como un azúcar y un antioxidante tal como un eliminador de radicales libres o un agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos. La elección de un componente cualquiera, por ejemplo, un quelante, puede determinar si es deseable o no otro componente (por ejemplo, un eliminador de radicales). La composición final formulada para administración debe ser estéril y/o estar libre de pirógenos. El experto puede determinar empíricamente qué combinaciones de estos y de otros componentes serán óptimas para su inclusión en el conservante que contiene composiciones inmunógenas de la invención dependiendo de una diversidad de factores tales como el almacenamiento particular y las condiciones de administración requeridas.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tampones fisiológicamente aceptables seleccionados de, pero sin limitarse a, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En determinadas realizaciones, la formulación se tampona dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente desde aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la composición inmunógena o de la formulación de la invención. El pH de una formulación de la invención se puede ajustar usando técnicas estándar en la técnica. El pH de la formulación se puede ajustar para que esté entre 3,0 y 8,0. En determinadas realizaciones, el pH de la formulación puede estar, o se puede ajustar para que esté, entre 3,0 y 6,0, 4,0 y 6,0, o 5,0 y 8,0. En otras realizaciones, el pH de la formulación puede estar, o se puede ajustar para que sea, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, o aproximadamente 8,0. En determinadas realizaciones, el pH puede estar, o se puede ajustar para que esté, en un intervalo desde 4,5 hasta 7,5, o desde 4,5 hasta 6,5, desde 5,0 hasta 5,4, desde 5,4 hasta 5,5, desde 5,5 hasta 5,6, desde 5,6 hasta 5,7, desde 5,7 hasta 5,8, desde 5,8 hasta 5,9, desde 5,9 hasta 6,0, desde 6,0 hasta 6,1, desde 6,1 hasta 6,2, desde 6,2 hasta 6,3, desde 6,3 hasta 6,5, desde 6,5 hasta 7,0, desde 7,0 hasta 7,5 o desde 7,5 hasta 8,0. En una realización específica, el pH de la formulación es aproximadamente de 5,8.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, incluyendo pero sin limitarse a  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  y  $MnCl_2$ , a una concentración que varía desde aproximadamente 0,1 mM hasta aproximadamente 10 mM, siendo preferida de hasta aproximadamente 5 mM.

5 En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende una o más sales, incluyendo pero sin limitarse a cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio y sulfato de potasio, presentes a una fuerza iónica que es fisiológicamente aceptable para el sujeto sobre la administración parenteral e incluidas en una concentración final para producir una fuerza iónica u osmolaridad seleccionada en la formulación final. La fuerza iónica u osmolalidad final de la formulación se determinará por  
10 múltiples componentes (por ejemplo, iones de compuesto(s) de tamponación y otras sales no tamponantes. Una sal preferida, NaCl, está presente en un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM, seleccionándose las concentraciones de sal para complementar otros componentes (por ejemplo, azúcares) de modo que la osmolaridad total final de la formulación sea compatible con la administración parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular o subcutánea) y promoverá la estabilidad a largo plazo de los componentes inmunógenos de la formulación de  
15 composición inmunógena sobre diversos intervalos de temperatura. Las formulaciones libres de sal tolerarán un incremento en los intervalos del uno o más crioprotectores seleccionados hasta mantener los niveles de osmolaridad final deseada.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores seleccionados de pero sin limitarse a disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) y polihidroxi-carburos (por ejemplo, dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).  
20

En determinadas realizaciones, la osmolaridad de la formulación está en un intervalo de desde aproximadamente 200 mOs/l hasta aproximadamente 800 mOs/l, con un intervalo preferido de desde aproximadamente 250 mOs/l hasta aproximadamente 500 mOs/l, o de aproximadamente 300 mOs/l - aproximadamente 400 mOs/l. Una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, desde aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un  
25 25 % de sacarosa y preferentemente desde aproximadamente un 7 % hasta aproximadamente un 15 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 12 % de sacarosa. De forma alternativa, una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, desde aproximadamente un 3 % hasta aproximadamente un 12 % de sorbitol y preferentemente desde aproximadamente un 4 % hasta un 7 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 6 % de sorbitol. Si se añade una sal, tal como cloruro de sodio, entonces se disminuye relativamente el intervalo efectivo de sacarosa o sorbitol. Estas y otras consideraciones de osmolalidad y osmolaridad se conocen bien en la técnica.  
30

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de oxidación de radicales libres y/o agentes quelantes. En la técnica se conoce una diversidad de eliminadores y quelantes de radicales libres y se aplican a las formulaciones y a los procedimientos de uso descritos en el presente documento. Ejemplos incluyen pero no se limitan a etanol, EDTA, una combinación de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico/succinato, ácido málico/maleato, Desferal, EDDHA y DTPA y diversas combinaciones de dos o más de los anteriores. En determinadas realizaciones, se puede añadir al menos un eliminador de radicales libres no reductor a una concentración que potencie eficazmente la estabilidad a largo  
40 plazo de la formulación. También se pueden añadir uno o más inhibidores de oxidación de radicales libres/quelantes en diversas combinaciones, tales como un eliminador de radicales y un catión divalente. La elección del quelante determinará si se necesita o no la adición de un eliminador de radicales.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos no iónicos, incluyendo pero sin limitarse a ésteres de ácidos grasos de polioxi-etilen sorbitán, Polioxisorbato-80 (Tween 80), Polioxisorbato-60 (Tween 60), Polioxisorbato-40 (Tween 40) y Polioxisorbato-20 (Tween 20), alquil éteres de polioxi-etileno, incluyendo pero sin limitarse a Brij 58, Brij 35, así como otros tales como Tritón X-100; Tritón X-114, NP40, Span 85 y la serie Pluronic de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Pluronic 121), con componentes preferidos Polioxisorbato-80 a una concentración desde aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 % (siendo preferido hasta aproximadamente un 0,25 %) o Polioxisorbato-40 a una concentración desde aproximadamente un 0,001 % hasta un 1 % (siendo preferido hasta  
50 aproximadamente un 0,5 %).

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención comprende uno o más agentes estabilizadores adicionales adecuados para la administración parenteral, por ejemplo, un agente reductor que comprende al menos un grupo tiol (-SH) (por ejemplo, cisteína, N-acetilcisteína, glutatión reducido, tioglucolato de sodio, tiosulfato, monotioglicerol, o mezclas de los mismos). De forma alternativa u opcionalmente, formulaciones de composiciones inmunógenas que contienen conservantes de la invención se pueden estabilizar además retirando el oxígeno de los recipientes de almacenamiento, protegiendo la formulación de la luz (por ejemplo, usando recipientes de vidrio ámbar).  
55

Las formulaciones de composiciones inmunógenas que contienen conservantes de la invención pueden comprender uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que incluye cualquier excipiente que no  
60



induzca por sí mismo una respuesta inmunitaria. Los excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a macromoléculas tales como proteínas, sacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col., 2001, *Vacuna*, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados de lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas). Tales vehículos se conocen bien por los expertos en la técnica. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se discuten, por ejemplo, en Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN:0683306472.

Las composiciones de la invención pueden ser liofilizadas o en forma acuosa, es decir soluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas se pueden administrar de forma ventajosa directamente desde su forma envasada y por tanto son ideales para la inyección sin la necesidad de su reconstrucción en medio acuoso como se requiere en cambio para composiciones liofilizadas de la invención.

Se puede llevar a cabo la administración directa de composiciones inmunógenas de la presente invención a un sujeto por administración parenteral (por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, o en el espacio intersticial de un tejido); o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auricular, pulmonar o mucosal diferente. En una realización preferida, la administración parenteral es por inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o en la parte superior del brazo del sujeto. La inyección puede ser por medio de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente se puede usar una inyección libre de aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml. Las composiciones de la invención se pueden preparar de varias formas, por ejemplo, para inyección como soluciones o bien suspensiones líquidas. En determinadas realizaciones, la composición se puede preparar como un polvo o una pulverización para administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición se puede preparar como un supositorio o pesario, o para administración nasal, auricular u ocular, por ejemplo, como una pulverización, gotas, gel o polvo.

Las cantidades óptimas de los componentes para una composición inmunógena particular se pueden establecer por estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunitarias apropiadas en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

#### *Envasado y formas de dosificación*

Las composiciones inmunógenas de la invención se pueden envasar en forma de dosis unitaria o de multidosis (por ejemplo 2 dosis, 4 dosis o más). Para las formas multidosis, normalmente se prefieren los viales pero no necesariamente, sobre las jeringuillas pre-cargadas. Los formatos multidosis adecuados incluyen pero no se limitan a: de 2 a 10 dosis por recipiente a 0,1 a 2 ml por dosis. En determinadas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml. Véase, por ejemplo, la solicitud internacional de patente WO2007/127668.

Las composiciones se pueden presentar en viales u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o se pueden presentar en dispositivos de administración pre-cargados, por ejemplo, jeringuillas con componente individual o múltiple, que se puede suministrar con o sin agujas. Normalmente aunque no necesariamente, una jeringuilla contiene una dosis individual de la composición inmunógena que contiene conservante de la invención, aunque también se prevén las jeringuillas pre-cargadas, multidosis. Asimismo, un vial puede incluir una dosis individual aunque de forma alternativa puede incluir dosis múltiple.

Se pueden establecer rutinariamente volúmenes de dosificación efectiva, aunque una dosis típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En determinadas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano. En determinadas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano adulto, joven, adolescente, niño o infante (es decir, no más de un año de edad) y en realizaciones preferidas se puede administrar por inyección.

Las composiciones inmunógenas líquidas de la invención también son adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunógenas que se presentan en forma liofilizada. Cuando una composición inmunógena se va a usar para reconstitución extemporánea de este tipo, la invención proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringuillas listas para cargar, o uno o más de cada uno, usándose los contenidos de la jeringuilla para reconstituir los contenidos del vial antes de la inyección, o viceversa.

De forma alternativa, las composiciones inmunógenas de la presente invención se pueden liofilizar y reconstituir usando, por ejemplo, uno de una multitud de procedimientos para el secado por congelación muy conocidos en la técnica para formar partículas conformadas (por ejemplo, esféricas) regulares secas, tales como microgránulos o microesferas, que tienen características de partícula tales como tamaños de diámetro que se pueden seleccionar y controlar variando los procedimientos exactos usados para prepararlos. Las composiciones inmunógenas pueden comprender además un coadyuvante que opcionalmente se puede preparar con o contener en partículas conformadas (por ejemplo, esféricas) regulares, secas, separadas tales como microgránulos o microesferas. En tales realizaciones, la presente invención proporciona además un kit de composición inmunógena que comprende un primer componente que incluye una composición inmunógena seca, estabilizada, que comprende opcionalmente además uno o más conservantes de la invención y un segundo componente que comprende una solución acuosa estéril para la reconstitución del primer componente. En determinadas realizaciones, la solución acuosa comprende uno o más conservantes y opcionalmente puede comprender al menos un coadyuvante (véase, por ejemplo, el

documento WO2009/109550.

En otra realización más, un recipiente del formato multidosis se selecciona de uno o más del grupo que consiste en, pero no se limita a, artículos de vidrio de laboratorio generales, matraces, vasos de precipitados, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, conductos, tubos, bolsas, frascos, viales, cierres para viales (por ejemplo, un tapón de goma, un tapón de rosca), ampollas, jeringuillas, jeringuillas duales o multicámara, tapones para jeringuillas, émbolos para jeringuilla, cierres de goma, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y plumas desechables y similares. El recipiente de la presente invención no está limitado por el material de fabricación e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, termoplástico-elastómeros). En una realización particular, el recipiente del formato es un vial de vidrio de Schott Tipo 1 de 5 ml con un tapón de butilo. El experto en la técnica apreciará que el formato descrito anteriormente no es de ningún modo una lista exhaustiva, sino que sirve simplemente como una orientación para el trabajador con respecto a la variedad de formatos disponibles para la presente invención. Se pueden encontrar otros formatos contemplados para su uso en la presente invención en catálogos publicados de proveedores y fabricantes de equipo de laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1: procedimientos experimentales

#### Ensayo bactericida del suero

Se inmunizaron macacos cangrejeros (n = 5/grupo) por vía intramuscular con proteínas rLP2086 o rP2086 (A + B) adsorbidas en AlPO<sub>4</sub>. Los macacos cangrejeros son un ejemplo de primates no humanos. Se vacunaron los animales a las semanas 0, 4 y 24 y se determinaron IgG específica para ORF2086 y valoraciones de anticuerpos funcionales a las semanas 0, 4, 6 y 26. Se determinaron valoraciones de IgG específica para ORF2086 del suero frente a rLP2086A y B.

Se examinaron valoraciones de anticuerpos funcionales por ensayo bactericida del suero (SBA) frente a cepas de *Neisseria meningitidis* que expresaban LP2086 con secuencias homólogas o bien heterólogas a las contenidas en la vacuna.

Se determinaron anticuerpos bactericidas del suero en macacos o conejos inmunizados con vacuna de ORF2086 usando SBA con complemento humano. Se inactivaron con calor los sueros inmunitarios de conejo o los sueros inmunitarios de macacos para eliminar la actividad del complemento intrínseca y posteriormente se diluyeron en serie 1:2 en PBS de Dulbecco con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (D-PBS) en una placa de microvaloración de 96 pocillos para someter a prueba para determinar la actividad bactericida del suero frente a cepas de *N. meningitidis*. Se hicieron crecer las bacterias usadas en el ensayo en medio de GC complementado con complemento de Kellogg (GCK) y se monitorizaron por densidad óptica a 650 nm. Se cosecharon las bacterias para su uso en el ensayo a una DO<sub>650</sub> final de 0,50-0,55, se diluyeron en D-PBS y se añadieron 1000-3000 de UFC a la mezcla de ensayo con un 20 % de complemento humano.

Se usó suero humano con actividad bactericida no detectable como fuente de complemento exógeno. Se sometieron a prueba las fuentes de complemento para determinar la idoneidad frente a cada cepa de prueba individual. Se usó una fuente de complemento solo si el número de bacterias que sobrevivieron en los controles sin sueros inmunitarios añadidos era >75 %. Se requirieron diez fuentes de complemento únicas para llevar a cabo los SBA descritos en este estudio.

Después de incubación de 30 min de incubación a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5 %, se añadió D-PBS a la mezcla de reacción y se transfirieron alícuotas a placas de microfiltro con medio GCK 50 %. Se filtraron las placas de microfiltro, se incubaron durante toda una noche a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5 % y se tiñeron y se cuantificaron microcolonias. Se definieron las valoraciones bactericidas séricas como las diluciones séricas recíprocas interpoladas que dieron una reducción del 50 % en UFC en comparación con la UFC en pocillos de control sin sueros inmunitarios. Se define la valoración de SBA como el recíproco de la dilución interpolada del suero de prueba que provoca una reducción del 50 % en recuentos de bacterias después de 30min de incubación a 37°C. Se estableció la susceptibilidad a la destrucción con sueros inmunitarios de ORF2086 si había un aumento de 4 veces o más en la valoración de SBA para sueros inmunitarios de ORF2086 en comparación con los sueros pre-inmunitarios correspondientes. Los sueros que fueron negativos frente a la cepa de ensayo en la dilución inicial se asignaron a una valoración de la mitad del límite de detección para el ensayo (es decir, 4).

### Ejemplo 2: clonación y expresión de variantes de ORF2086 no lipidadas

Se derivó originalmente la secuencia de aminoácidos de P2086 madura correspondiente a los residuos 27-286 de la cepa *N. meningitidis* M98250771 (A05) de la amplificación de PCR a partir de ADN genómico. El cebador directo, con una secuencia de TGCCATATGAGCAGCGGAAGCGGAAG (SEQ ID NO: 22), se fusionó a la secuencia 5' y contenía un sitio para la clonación. El cebador inverso, con una secuencia de CGGATCCCTACTGTTTGCCGGCGATGC (SEQ ID NO: 23), se fusionó al extremo 3' del gen y contenía un codón de terminación TAG seguido del sitio de restricción BamHI. En primer lugar se clonó el fragmento amplificado de 799

5 pb en un vector intermedio PCR2.1 (Invitrogen, Carlsbac, CA) Se escindió este plásmido con NdeI y BamHI y se unió en el vector de expresión pET9a (Novagen, Madison, WI) que se había escindido con NdeI y BamHI. El vector resultante pLA100 (que incluye la SEQ ID NO: 54), expresó la subfamilia A05 de P2086 madura de la cepa M98250771 sin la cisteína del extremo N-terminal (véase la SEQ ID NO: 13 en la que la Cys del extremo N-terminal en la posición 1 está delecionada o la SEQ ID NO: 55) que estaría presente en la proteína lipídada. Se usó la cepa de huésped de *E. coli* BLR(DE3) [F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm Δ(srl-recA)306::Tn10 (TetR) (DE3)] (Novagen) para obtener la expresión de fHBP.

10 Se usaron las mismas etapas de clonación para preparar las variantes B02, B03, B09, B22, B24, B44, A04, A12 y A22 con Cys delecionada en el extremo N-terminal. También se prepararon las variantes que contienen Cys en el extremo N-terminal por el mismo procedimiento usando cebadores directos que también incluían el codón de Cys (por ejemplo, el primer codón de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1-11). Basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento, el experto podría diseñar cebadores directos e inversos para cada una de estas variantes. Por ejemplo, se usaron los siguientes cebadores para amplificar la variante no lipídada B44 seguida de la clonación en pET9a usando NdeI y BpI.

15 Tabla 1

Cys en N-terminal	Secuencia del cebador	SEC ID N.º
Dir. incluido	5' TTTCTTcccgggAAGGAGatatacatatg TGCAGCAGCGGAGGCGGCGG 3'	24
Inv. incluido	5' TTTCTTgctcagcaTTATTGC TTGGCGGCAAGACCGAT 3'	25
Dir. suprimido	5' TTTCTTcccgggAAGGAGatatacatatg AGCAGCGGAGGCGGCGG 3'	26
Inv. suprimido	5' TTTCTTgctcagcaTTATTGC TTGGCGGCAAGACCGAT 3'	27

### Resultados

20 Las construcciones de plásmidos no lipídadas se expresaron fuertemente, pero las variantes de proteínas no lipídadas estaban piruviladas en el residuo de Cys N-terminal. Véanse los ejemplos 8 y 9, que describen, por ejemplo, un procedimiento para expresar las construcciones. Para obtener esta piruvilación, se delecionó el codón Cys N-terminal. Véase, por ejemplo, el ejemplo 10. La deleción del Cys N-terminal, sin embargo, dejó sin efecto la expresión de las variantes A22 y B22. Véase, *por ejemplo*, la Figura 4. Sin embargo, las variantes A05, B01 y B44, aún se expresan a pesar de la deleción del residuo Cys N-terminal. Véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 13 (A05), en la que el Cys N-terminal en la posición 1 está suprimido, SEQ ID NO: 35 (extremo N-terminal de B01) y SEQ ID NO: 21 (B44), en las que el N-terminal en la posición 1 está delecionado. Véase, *por ejemplo*, la Figura 5. Además, la expresión de la variante B09 no lipídada no se vio afectada por la deleción del residuo de Cys en N-terminal. Véase, por ejemplo, el ejemplo 4.

### Ejemplo 3: efecto del tallo Gly/Ser sobre la expresión de la variante no lipídada

30 Para determinar porqué las variantes A05, B01 y B44 se expresaron en ausencia de Cys N-terminal y las variantes A22 y B22 no, se alinearon las secuencias de estas variantes. Las variantes A05, B01 y B44 poseen todas una serie extendida de 10 u 11 residuos Gly y Ser siguiendo inmediatamente la Cys N-terminal (es decir, un tallo Gly/Ser). Sin embargo, las variantes A22 y B22, solo tenían un tallo Gly/Ser que consiste en 6 residuos Gly y Ser. En consecuencia, se expandió el tallo Gly/Ser de las variantes A22 y B22 por inserción de residuos Gly y Ser adicionales.

35 Se prepararon variantes de tallo Gly/Ser largo por los procedimientos descritos en el ejemplo 2 usando cebadores directos que codifican un tallo Gly/Ser con 10 o bien 11 residuos Gly y Ser.

40 Las variantes A22 y B22 de tallo Gly/Ser largo (10-11 residuos Gly/Ser) con Cys N-terminal delecionada mostraron un incremento en la expresión sobre las variantes de tallo Gly/Ser corto (6 residuos Gly/Ser) con Cys N-terminal suprimida. Sin embargo, estos niveles de expresión, todavía eran reducidos en comparación con los niveles de expresión de las variantes A05, B01 y B44.

**Ejemplo 4: optimización de codones**

La expresión de la variante B09 no lipidada no se vio afectada por la delección del residuo Cys N-terminal (véase, SEQ ID NO: 18, en la que la cisteína en la posición 1 está suprimida, o SEQ ID NO: 49). Véase, *por ejemplo*, la Figura 6. La evaluación de la secuencia de la variante B09 demostró que la variante B09 tiene un tallo Gly/Ser que consiste en 6 residuos Gly y Ser, similar al tallo Gly/Ser de las variantes A22 y B22. En efecto, las colas N-terminales de las variantes B09 y A22 son idénticas en el nivel de aminoácidos. Las colas N-terminales de las variantes B09 y A22 (SEQ ID NO: 53 y 42, respectivamente), sin embargo, varían en el nivel de aminoácidos en 2 nucleótidos: nucleótidos 15 y 39 de SEQ ID NO: 8. Véase, *por ejemplo*, la Figura 6. Los 14 primeros aminoácidos de la cola N-terminal de la variante B22 son idénticos a los de las variantes B09 y A22 y la cola N-terminal de la variante B22 solo difiere en el 15º aminoácido. Los nucleótidos 1-42 de la variante B22 son idénticos a los nucleótidos 1-42 de la variante A22. Los nucleótidos 1-42 de la variante B22 (véase SEQ ID NO: 52) son idénticos a los nucleótidos 1-42 de B09 (véase SEQ ID NO: 53) salvo por las diferencias en los nucleótidos 15 y 39, cuando se alinean de forma óptima. En consecuencia, la variante B22 difiere de la variante B09 en los nucleótidos 15 y 39 de la SEQ ID NO: 8. Para determinar si las diferencias en los ácidos nucleicos afectaron al nivel de expresión de la variante B09 en comparación con las variantes A22 y B22, las variantes A22 y B22 se mutaron por mutación puntual para incorporar los nucleótidos 15 y 39 en los codones correspondientes para Gly5 y Gly13. La incorporación de estas mutaciones de ácidos nucleicos inactivados incrementó significativamente la expresión de las variantes con Cys en N-terminal delecionada A22 y B22 a niveles similares a la variante B09 con Cys en N-terminal delecionada. Véase, *por ejemplo*, la Figura 7. En consecuencia, la optimización de codones para hacer pareja la variante B09 puede incrementar la expresión de las variantes P2086 no lipidadas con Cys N-terminal delecionada.

Otro análisis de las secuencias de las variantes no lipidadas sugirió optimizaciones de codones adicionales en el tallo Gly/Ser para mejorar la expresión. En consecuencia, se construyeron variantes no lipidadas adicionales por el procedimiento del ejemplo 2 usando cebadores directos que comprenden tales secuencias optimizadas de codones. Los cebadores directos usados para generar tallos Gly/Ser optimizados incluyen cualquiera de las siguientes secuencias:

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 28)  
M S S G G G G S G G G G (SEQ ID NO: 29)

ATGAGCTCTGGAAGCGGAAGCGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 30)  
M S S G S G S G G G G (SEQ ID NO: 31)

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGA (SEQ ID NO: 32)  
M S S G G G G (SEQ ID NO: 33)

ATGAGCAGCGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 34)  
M S S G G G G (SEQ ID NO: 33)

**Ejemplo 5: optimización de la formulación de composición inmunógena**

Las vacunas formuladas con ISCOMATRIX generan una respuesta inmunitaria rápida dando como resultado una reducción en el número de dosificaciones requeridas para lograr una tasa de respuesta de más de 4 veces como se mide en un ensayo bactericida del suero. Se inmunizaron grupos de cinco macacos rhesus con diferentes formulaciones de una vacuna de rP2086 no lipidada bivalente. La vacuna incluyó una variante A05 no lipidada no piruvilada (SEQ ID NO: 13, en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o SEQ ID NO: 55 codificada por SEQ ID NO:54) y una variante B44 no lipidada no piruvilada (SEQ ID NO: 21, en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o SEQ ID NO: 44 codificada por SEQ ID NO: 51). Las unidades de coadyuvante son como sigue: AIPO<sub>4</sub> es de 250 mcg, ISCOMATRIX está entre 10 y 100 mcg. Las unidades de coadyuvante para AIPO<sub>4</sub> mostradas en las tablas 2-5 se muestran como unidades en miligramos y por lo tanto se muestran como 0,25 (miligramos) en lugar de 250 mcg.

El programa de inmunización fue de 0, 4 y 24 semanas con extracciones en las semanas 0, 4, 6 y 26. No hubo incrementos en las valoraciones de SBA en la postdosis uno para cualquiera de los grupos. En la postdosis dos, se observó un incremento en las valoraciones de SBA y en el número de respondedores según se definió por un incremento de 4 veces por encima del valor de referencia de la valoración de SBA anterior para formulaciones que contenían el coadyuvante ISCOMATRIX. Las tablas 2 y 3 proporcionan las GMT de SBA observadas para una cepa de subfamilia A y B de fHBP, respectivamente. Las GMT de SBA para las formulaciones con ISCOMATRIX fueron 3-19 y 4-24 veces mayores que las observadas para la formulación con AIPO<sub>4</sub> para las cepas de subfamilias A y B, respectivamente. También se observaron valoraciones potenciadas en la postdosis tres para las formulaciones con ISCOMATRIX en 13-95 y 2-10 para la cepa de subfamilia Ay B de fHBP respectivamente en comparación con la formulación con AIPO<sub>4</sub>. El análisis de las tasas de respondedores, según se define por un incremento de cuatro veces o mayor en la valoración de SBA sobre el valor de referencia reveló una tendencia similar (tablas 4 y 5).

Tabla 2: valoraciones de SBA (GMT) obtenidas frente a un suero inmunitario de cepa de subfamilia A de LP2086 de MnB de macacos rhesus inmunizados con diferentes formulaciones de una vacuna rP2086 bivalente

Vacuna	lipidación	Coadyuvante		Valoración geométrica promedio (GMT)			
		AIPO4	ISCOMATRIX®	sem. 0	sem. 4	sem. 6	sem. 26
A05/B44	-	0,25	-	-	-	-	+
		-	10	-	-	+	+++
		0,25	10	-	-	+	++
		-	100	-	-	++	++++
		0,25	100	-	-	+	+++

Cinco monos por grupo; programa de inmunización: 0, 4, 24 semanas; programa de extracción de sangre: semanas 0, 4, 6 y 26. Cepa de prueba de SBA MnB M98 250771. “-“ < 8; “+” 8-32; “++” 33-128; “+++” 129-512; “++++” >512

Tabla 3: valoraciones de SBA (GMT) obtenidas frente a un suero inmunitario de cepa de subfamilia B de LP2086 de MnB de macacos rhesus inmunizados con diferentes formulaciones de una vacuna rP2086 bivalente

Vacuna	lipidación	Coadyuvante		Valoración geométrica promedio (GMT)			
		AIPO4	ISCOMATRIX®	sem. 0	sem. 4	sem. 6	sem. 26
A05/B44	-	0,25	-	-	-	+	+++
		-	10	-	-	+++	++++
		0,25	10	-	-	+++	++++
		-	100	-	-	+++	++++

Cinco monos por grupo; programa de inmunización: 0, 4, 24 semanas; programa de extracción de sangre: semanas 0, 4, 6 y 26. Cepa de prueba de SBA MnB CDC1127. “-“ < 8; “+” 8-32; “++” 33-128; “+++” 129-512; “++++” >512

Tabla 4: número de macacos rhesus con un aumento de  $\geq 4$  veces en la valoración de SBA usando una cepa de subfamilia A de LP2086 de MnB

Vacuna	lipidación	Coadyuvante		N.º de respondedores <sup>b</sup>			
		AIPO4	ISCOMATRIX®	sem. 0	sem. 4	sem. 6	sem. 26
A05/B44	-	0,25	-	0	0	0	2
		-	10	0	0	3	5
		0,25	10	0	0	2	5
		-	100	0	0	4	5
		0,25	100	0	0	2	5

Tabla 5: número de macacos rhesus con un aumento de  $\geq 4$  veces en la valoración de SBA usando una cepa de subfamilia A de LP2086 de MnB

Vacuna	lipidación	Coadyuvante		N.º de respondedores <sup>b</sup>			
		AIPO4	ISCOMATRIX®	sem. 0	sem. 4	sem. 6	sem. 26
A05/B44	-	0,25	-	0	0	3	5
		-	10	0	0	5	5
		0,25	10	0	0	5	5
		-	100	0	0	4	4
		0,25	100	0	0	3	5

5 **Ejemplo 6: inmunoprotección conferida por variantes lipidadas y no lipidadas**

Una variante de P2086 no lipidada expresada recombinantemente (B44) induce una protección amplia como se mide

5 por SBA frente a cepas que representan diversas variantes de las fHBP (desde aproximadamente un 85 % hasta aproximadamente un <92 % de ID) de secuencias de LP2086. Estas tasas de respuesta se obtuvieron para una vacuna no lipídada formulada con AIPO<sub>4</sub>. Véase la tabla 6, que muestra tasas de respuesta de SBA para una cepa de MnB de subfamilia B de fHBP generada por una vacuna de fHBP bivalente. La vacuna no lipídada (representada por un “-“ bajo la columna “lipidación”) incluyó una variante A05 no lipídada no piruvilada (SEQ ID NO: 13 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está delecionada) y una variante B44 no lipídada, no piruvilada (SEQ ID NO: 21, en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está delecionada).

10 De forma alternativa, una variante de P2086 no lipídada expresada recombinantemente (B44) induce mayores respuestas inmunitarias como se mide por la valoración de SBA que una variante lipídada (B01) frente a cepas que portan secuencias de LP2086 similares (>92 % de ID) y diversas (<92 % de ID). Las tasas de respuesta más altas (según se definen por un incremento de cuatro veces o mayor en las valoraciones de SBA sobre el valor de referencia) se observaron para la vacuna que contenía B44 de rP2086 no lipídada en comparación con la vacuna B01 de rLP2086 lipídada (tabla 6).

15 De acuerdo con la tabla 6, B44 no lipídada es un componente de subfamilia B preferido de fHBP en una composición para proporcionar amplia cobertura frente a (por ejemplo, provocar anticuerpos bactericidas frente a) cepas de variantes de LP2086 múltiples.

20 Sorprendentemente, los inventores anotaron que es poco probable que las cepas de variante B09 de LP2086 tengan tasas de respuesta de SBA positivas con respecto a polipéptidos ORF2086 heterólogos (no B09). En particular, los inventores encontraron que B09 de LP2086 es una excepción en términos de una cepa de ensayo frente a la que la composición inmunógena de A05/B44 descrita en la tabla 6 provoca anticuerpos bactericidas. Por lo tanto, en una realización preferida, una composición inmunógena de la invención incluye un polipéptido B09, en particular en el contexto de una composición que incluye más de un polipéptido de subfamilia B de ORF2086. En una realización preferida, una composición inmunógena que incluye B44 no lipídada también puede incluir también un polipéptido B09 no lipídado.

Tabla 6: Tasas de respuesta de SBA para cepas de MnB de una subfamilia B de fHBP generadas por suero inmunitario de vacunas de fHBP bivalentes de macacos rhesus.

Coadyuvante	Variante de LP2086 de cepa de ensayo	Vacuna	lipidación	% de ID para subfamilia apareada para componente de vacuna no lipídado	% de respondedores PD3 sem. 26
	B02	A05/B01	+	<b>99,6</b>	80
		<b>A05/B44</b>	-		100
AIPO <sub>4</sub> 0,25mg	B03	A05/B01	+	86,7	50
		<b>A05/B44</b>	-		80
	B09	A05/B01	+	86,3	0
		<b>A05/B44</b>	-		0
	B15	A05/B01	+	86,7	25
		<b>A05/B44</b>	-		80
	B16	A05/B01	+	87,1	0
		<b>A05/B44</b>	-		50
	B16	A05/B01	+	87,1	0
		<b>A05/B44</b>	-		60
B24	A05/B01	+	85,9	0	
	<b>A05/B44</b>	-		60	
	B44	A05/B01	+	100	100
		<b>A05/B44</b>	-		100
ISCOMATRIX® (10 mcg)	A05	<b>A05/B44</b>	-	100	100
ISCOMATRIX® (100 mcg)	A05	<b>A05/B44</b>	-	100	80
ISCOMATRIX® (10 mcg)	A22	<b>A05/B44</b>	-	88,9	80
ISCOMATRIX® (100 mcg)	A22	<b>A05/B44</b>	-	88,9	100

Cinco monos por grupo; programa de inmunización: semanas 0, 4, 24; programa de extracción de sangre: semanas 0, 4, 6 y 26.

**Ejemplo 7: optimización de codones de las variantes B44 y B09**

Aunque los niveles de expresión logrados en los ejemplos precedentes eran adecuados para muchas aplicaciones, fue deseable otra optimización y se prepararon y se sometieron a prueba construcciones de expresión de *E. coli* que contenían optimización de codones adicional sobre la longitud total de la proteína. Se encontró que una secuencia mejorada de este tipo para la expresión de una proteína B44 sin Cys era la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEQ ID NO: 43. Como se muestra en el ejemplo 9, la construcción de expresión que contenía SEQ ID NO: 43 mostró una expresión potenciada en comparación con la secuencia de tipo silvestre no optimizada.

Se mejoró la expresión de la proteína B09 con la Cys en N-terminal delecionada aplicando cambios de codones de la construcción de B44 optimizada anteriormente (SEQ ID NO: 43) a la B09 (SEQ ID NO: 48). Para generar secuencias de B09 optimizadas, en primer lugar se alineó la secuencia de ADN optimizada de B44 (SEQ ID NO: 43) con la secuencia de ADN del alelo de B09 (SEQ ID NO: 48). Se optimizó la secuencia de codificación no lipidada completa del alelo de B09 (SEQ ID NO: 48) para reflejar los cambios de codones observados en el alelo optimizado de B44 (SEQ ID NO: 43) siempre que los aminoácidos entre B44 (SEQ ID NO: 44) y B09 (SEQ ID NO: 49) sean idénticos. Las secuencias de codones en el alelo de B09 que corresponden a los aminoácidos idénticos entre el alelo de B09 y el alelo de B44 se cambiaron para reflejar el codón usado en la secuencia optimizada de B44 (SEQ ID NO: 43). Las secuencias de codones para aminoácidos que diferían entre B09 (SEQ ID NO: 49) y B44 (SEQ ID NO: 44) no se cambiaron en la secuencia de ADN de B09.

Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de B44 no lipidada (SEQ ID NO: 44) contiene dos secuencias de repetición serina-glicina secuenciales (S-G-G-G) (SEQ ID NO: 56) (véanse también los aminoácidos de 2 a 6 de SEQ ID NO: 44) en su extremo N-terminal, mientras que el alelo de B09 solo contiene una repetición serina-glicina en el extremo N-terminal (véanse los aminoácidos de 2 a 6 y los aminoácidos de 7 a 11 de SEQ ID NO: 49). Las dos repeticiones serina-glicina en el extremo N-terminal de B44 (aminoácidos de 2 a 6 y aminoácidos de 7 a 11 de SEQ ID NO: 44) también tenían usos de codones diferentes (véanse los nucleótidos de 4 a 18 y los nucleótidos de 19 a 33 de SEQ ID NO: 43) y diferentes combinaciones de la repetición serina-glicina de B44 optimizada (por ejemplo, nucleótidos de 4 a 18 de SEQ ID NO: 43, o bien nucleótidos de 19 a 33 de SEQ ID NO: 43, o bien una combinación de los mismos) se aplicaron a la secuencia de ADN de B09 (SEQ ID NO: 48, por ejemplo, aplicada a los nucleótidos de 4 a 18 de SEQ ID NO: 48) para examinar el efecto sobre la expresión de proteínas recombinantes.

Se construyeron tres versiones diferentes de B09 optimizada: La SEQ ID NO: 45 contiene ambas repeticiones serina-glicina (GS1 y GS2) (ácidos nucleicos de 4 a 33 de SEQ ID NO: 43) de la B44 optimizada, la SEQ ID NO: 46 contiene GS1 (ácidos nucleicos de 4 a 18 de SEQ ID NO: 43) y la SEQ ID NO: 47 contiene GS2 (ácidos nucleicos de 19 a 33 de SEQ ID NO: 43). Se sintetizó químicamente el ADN para todas las secuencias optimizadas de codones anteriores usando un estándar en la técnica de la química. Se clonó el ADN resultante en vectores de expresión de plásmidos apropiados y se sometió a prueba para determinar la expresión en células huésped de *E. coli* como se describe en los ejemplos 8 y 9.

**Ejemplo 8: procedimiento para la expresión de una variante B09, de ORF2086**

Se transformaron células de la cepa K-12 de *E. coli* (derivados de W3110 de tipo silvestre (CGSC4474) que tenían deleciones en *recA*, *thua* y *araA*) con el plásmido pEB063, que incluye la SEQ ID NO: 45, pEB064, que incluye SEQ ID NO: 46, el plásmido pEB065, que incluye la SEQ ID NO: 47, o el plásmido pLA134, que incluye la SEQ ID NO: 48. Las modificaciones preferidas para la cepa K-12 son útiles para los fines de fermentación pero no se requieren para la expresión de las proteínas.

Se inocularon células en un medio definido de glucosa-sales. Después de 8 horas de incubación a 37 °C, se aplicó un alimento de glucosa lineal y se continuó con la incubación durante tres 3 horas adicionales. Se añadió β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) al cultivo hasta una concentración final de 0,1 mM seguido de 12 horas de incubación a 37°C. Se recogieron las células por centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos y se lisaron por adición de "Easy-Lyse™ Cell Lysing Kit" de Lienco Technologies (St. Louis, MO) y un tampón de carga. Se analizaron los lisados aclarados para determinar la expresión de B09 por tinción Coomassie de geles de SDS-PAGE y/o análisis de transferencia de bandas tipo Western con cuantificación por un densitómetro de rastreo. Los resultados de la densitometría de rastreo están a continuación en la tabla 7:

Proteína	Célula huésped	Plásmido	Porcentaje de proteína celular total a las 12 horas post-inducción con IPTG, como se mide por SDS-PAGE, densitometría de barrido
B09	<i>E. coli</i> K-12	pEB063 SEQ ID NO: 45	24 %
B09	<i>E. coli</i> K-12	pEB065 SEQ ID NO: 47	12 %

(continuación)

Proteína	Célula huésped	Plásmido	Porcentaje de proteína celular total a las 12 horas post-inducción con IPTG, como se mide por SDS-PAGE, densitometría de barrido
B09	<i>E. coli</i> K-12	pEB064 SEQ ID NO: 46	38 %
B09	<i>E. coli</i> K-12	pLA134 SEQ ID NO: 48	13 %

**Ejemplo 9: procedimiento para la expresión de la variante B44, de ORF2086**

5 Se transformaron células de la cepa B de *E. coli* (BLR(DE3), Novagen) con plásmido pLN056, que incluye la SEQ ID NO: 51. Se transformaron células de la cepa K-12 de *E. coli* (derivada de W3110 de tipo silvestre) con el plásmido pDK087, que incluye la SEQ ID NO: 43. Se inocularon las células en un medio definido de glucosa-sales. Después de 8 horas de incubación a 37 °C se aplicó un alimento de glucosa lineal y se continuó con la incubación durante 3 horas adicionales. Se añadió β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) al cultivo hasta una concentración final de 0,1 mM seguido de 12 horas de incubación a 37 °C. Se recogieron las células por centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos y se lisaron por adición de "Easy-Lyse™ Cell Lysing Kit" de Lienco Technologies (St. Louis, MO) y tampón de carga. Se analizaron los sobrenadantes para determinar la expresión de B09 por tinción Coomassie de geles de SDS-PAGE y/o análisis de transferencia de bandas tipo Western, con cuantificación por densitómetro de rastreo. Los resultados de la densitometría de rastreo están a continuación en la tabla 8:

Proteína	Célula huésped	Plásmido	Porcentaje de proteína celular total a las 12 horas post-inducción con IPTG, como se mide por SDS-PAGE, densitometría de barrido
B44	<i>E. coli</i> B	pLN056 SEQ ID NO: 51	1 %
B44	<i>E. coli</i> K-12	pDK087 SEQ ID NO: 43	17 %

**Ejemplo 10: piruvilación**

El presente ejemplo demuestra que el residuo Cys N-terminal de proteínas ORF2086 no lipidadas se puede piruvilar cuando se expresa, por ejemplo, en *E. coli*.

20 Se monitorizó la acumulación de proteínas heterólogas durante la producción de variantes A05 (SEQ ID NO: 13) y B44 (SEQ ID NO: 21) usando cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC). Esta separación se interconectó con un espectrómetro de masas de dispersión de cuadrupolo (QTOF-MS) para proporcionar un medio de monitorizar la formación de las variantes relacionadas con el producto.

25 Después de expresarse en las células huésped de B y/o K-12 de *E. coli*, los productos derivados de estas fermentaciones sufrieron un procedimiento de purificación durante el que se observó una modificación del producto. La deconvolución de los espectros de masas caracterizó las variantes por exhibir cambios de masa de +70 Da, en comparación con los productos naturales de 27640 y 27572 Da para A05 y B44, respectivamente.

La literatura publicada indicó que se había observado previamente un cambio de masa de +70 Da en proteínas y se había atribuido a la piruvilación del residuo amino-terminal.

30 Se confirmó la presencia y la ubicación del piruvato usando los datos de fragmentación de espectros de masa (EM/EM). Los datos indicaron que la modificación se dio en el residuo de cisteína amino-terminal, es decir, el aminoácido en la posición 1, de acuerdo con A05 y B44. Para A05, el porcentaje de polipéptidos piruvilados era aproximadamente de un 30 %, en comparación con el número total de polipéptidos de A05 (SEQ ID NO: 13). Para B44, el porcentaje de polipéptidos piruvilados era aproximadamente de un 25 %, en comparación con el número total de polipéptidos de B44 (SEQ ID NO: 21).

35 Cuando se purificaron las variantes de A05 (SEQ ID NO: 13 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o SEQ ID NO: 55) y de B44 (SEQ ID NO: 21 en la que la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o SEQ ID NO: 44), que no contienen una cisteína amino-terminal, no hubo piruvilación detectable (+70 Da).



**Ejemplo 11: inmunogenicidad de B09 y B44, individualmente y en combinación**

Se inmunizaron 5-10 grupos de monos macacos rhesus con variante de B09 (SEQ ID NO: 49 codificada por SEQ ID NO: 48) o variante de B44 (SEQ ID NO: 44 codificada por SEQ ID NO: 43), o A05, B09 y B44 (SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 49 codificada por SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 44 codificada por SEQ ID NO: 43, respectivamente) formuladas con 250 mcg de AIPO<sub>4</sub> por dosis. Se vacunaron los monos por medio de la vía intramuscular a las semanas 0, 4 y 8 con 10 mcg cada uno de fHBP no lipídada sola o en combinación como se enumera en la tabla 9 y 10. Se analizaron las muestras séricas de ambas semanas 0 y 12 en SBA frente a cepas de MnB con las variantes de subfamilia A o bien de subfamilia B de fHBP. Se registraron respondedores como animales con un aumento de 4 x en la valoración. La variante de B44 sometida a prueba fue la construcción optimizada (SEQ ID NO: 43) y se mantuvieron las tasas de respuesta amplias que se observaron en estudios anteriores (tabla anterior) para la construcción optimizada (Tabla 9) la vacuna de B44 sola o en combinación con B09. La vacuna de B09 sola (Tabla 10) también pudo generar respuestas inmunitarias ampliamente reactivas de forma cruzada (Tabla 10).

Tabla 9: Tasas de respuesta obtenidas para vacunes de fHBP no lipídada en macacos rhesus

Vacuna (10 mcg por proteína);	% del aumento de $\geq 4 X$ frente a la variante de prueba (PD3; 10 macacos rhesus por grupo)				
	A05 (SEQ ID NO: 13)	B44 (SEQ ID NO: 21)	B16 (SEQ ID NO: 60)	B24 (SEQ ID NO: 20)	B09 (SEQ ID NO: 18)
B44	0	80	30	40	30
B44 + B09 +A05	60	80	40	50	50

Se inmunizaron i.m. macacos rhesus (n= 10) a las semanas 0, 4 y 8 con 10 mcg cada uno de fHBP no lipídada sola o en combinación como se enumeró en la columna Vacuna en la formulación con 250 mcg de AIPO<sub>4</sub>. Se analizaron las muestras séricas de ambas semanas 0 y 10 en SBA frente a las cepas de MnB enumeradas en la tabla. Se registran los respondedores como los animales con un aumento de 4 x en la valoración.

La tabla 9 indica, por ejemplo, que una composición que incluye una combinación de B44, B09 y A05 no lipídadas, no piruviladas mostraba una cobertura cruzada mayor frente a las variantes de prueba en comparación con la cobertura cruzada de una composición que incluía B44 sola. En vista de los resultados mostrados en la presente solicitud, incluyendo en particular la tabla 6 y la tabla 9 juntas, las composiciones que incluyen B44, B09 y A05 sola o en combinación son realizaciones preferidas de la presente invención. En particular, se dan a conocer las composiciones que incluyen tanto B44 como B09. Tal composición incluye además preferentemente un polipéptido de subfamilia A, tal como en particular A05.

Tabla 10: Tasas de respuesta obtenidas para vacuna de B09 de fHBP no lipídada en macacos rhesus

Vacuna (10 mcg por proteína)	% del aumento de $\geq 4 X$ frente a la variante de prueba (PD3; 5 macacos rhesus por grupo)				
	A05	B44	B16	B24	B09
B09	40	60	40	60	60

Se inmunizaron i.m. macacos rhesus (n=5) a las semanas 0, 4 y 8 con 10 mcg cada uno de fHBP no lipídada sola o en combinación como se enumeró en la columna Vacuna en la formulación con 250 mcg de AIPO<sub>4</sub>. Se analizaron las muestras séricas de ambas semanas 0 y 10 en SBA frente a las cepas de MnB enumeradas en la tabla. Se registran los respondedores como los animales con un aumento de 4 x en la valoración.

**Ejemplo 12: inmunoprotección conferida por construcción de variantes lipídadas y no lipídadas**

Se rastrearon previamente veinte conejos hembra New Zealand white, de 2,5-3,5 kg, obtenidos de Charles River Canadá, por ELISA celular completo y se seleccionaron 10 animales para este estudio basándose en sus valoraciones de fondo bajas frente a las cepas de prueba que representan variantes de fHBP B02 (SEQ ID NO: 16) y B44 (SEQ ID NO: 21) (Tabla 11). Se inmunizaron i.m. un grupo de tres animales con 100 µg de cada proteína formulada con 50 µg de ISCOMATRIX por 0,5 ml de dosis a las semanas 0, 4 y 9 (Tabla 12). Se vacunó el grupo 1 con B44 no lipídada (SEQ ID NO: 44). Se incluyó un grupo de control que se vacunó con B01 lipídada formulada con AIP04 (250 mcg) Se sometieron a extracción los conejos a las semanas 0, 4, 9 y 10. Se prepararon sueros individuales de la semana 10 y se analizaron por ensayo bactericida del suero frente a cepas meningocócicas de serogrupo B múltiples de la subfamilia B de fHBP.

Tabla 11: Conejos usados en el estudio

Especie:	Conejo
Raza:	New Zealand white
Fuente: <sup>a</sup>	Laboratorio Charles River
N.º de animales por grupo:	3
N.º total de animales:	9
Edad y sexo:	Hembra
Peso:	2,5-3,5 kg

Tabla 12

Grupo	N.º de animales	Variante	lipidada	rfHBP (µg/0,5 ml dosis)	ISCOMATRIX (µg/0,5 ml dosis)	Fosfato de aluminio (µg/0,5 ml dosis)
1	3	B44	-	100	50	
2	3	B01	-	100	50	
3	3	B01	+	100	-	100

5 Programa de inmunización, semanas 0, 4, 9; Programa de extracción, semanas 0, 4, 9, 10

10 Ensayo bactericida del suero (SBA): se realizó un ensayo bactericida del suero (SBA) basado en microcolonias frente a cepas meningocócicas de serogrupo B múltiples (tabla 13) sobre muestras séricas individuales. Se cualificaron los sueros humanos de donantes como la fuente de complemento para la cepa sometida a prueba en el ensayo. Se interpolaron valoraciones bactericidas dependientes de anticuerpos mediadas por complemento y se expresaron como el recíproco de la dilución del suero de prueba que destruyó el 50 % de las células meningocócicas en el ensayo. El límite de detección del ensayo era de una valoración de SBA de 4. Una valoración de SBA de <4 se asignó a un número de 2. Se calculó y se comparó un aumento de  $\geq 4$  veces de las valoraciones de SBA en sueros de la semana 10 en comparación con las valoraciones en las pre-extraídas.

15 La actividad de anticuerpos bactericida sérica como se mide en el SBA es el subrogado inmunológico de protección frente a la enfermedad meningocócica. Se determinó la capacidad de inmunización con rfHBP no lipidado para obtener anticuerpos bactericidas en conejos por SBA. SBA mide el nivel de anticuerpos en una muestra sérica mimetizando la lisis bacteriana mediada por complemento que se produce de forma natural. Se analizaron las muestras séricas de conejo recogidas en la semana 10 por SBA frente a cepas con una fHBP de B44 y con una fHBP de B02. Como se muestra en la tabla 13, una semana después de la tercera inmunización (semana 10), todas las muestras séricas mostraron actividad bactericida frente a ambas cepas de prueba (tabla 13). La B44 no lipidada (SEQ ID NO: 44) fue más inmunógena que la B01 no lipidada en conejos New Zealand frente a estas cepas. La B44 no lipidada (SEQ ID NO: 44) formulada con el coadyuvante Iscomatrix dio valoraciones comparables a la B01 lipidada formulada con fosfato de aluminio frente a estas cepas. En general, los sueros pre-extraídos de conejo no mostraron actividad bactericida preexistente frente a las cepas sometidas a prueba.

25 Tabla 13: Actividad bactericida sérica frente a cepas de subfamilia B de fHBP en conejos New Zealand White vacunados con fHBP no lipidada recombinante.

Variante de subfamilia B (formulación)	Valoraciones de SBA de GMT frente a variante de prueba	
	B44 (SEQ ID NO: 21)	B02 (SEQ ID NO: 16)
B44 no lipidada (SEQ ID NO: 44) (Iscomatrix)	6675	7140
B01 no lipidada (ISCOMATRIX)	625	1052
B01 lipidada (AIPO <sub>4</sub> )	10099	10558

### Ejemplo 13: inmunogenicidad de seis proteínas de unión al factor H no lipidadas en conejos New Zealand white.

30 Se inmunizaron grupos de 6 conejos con variantes de fHBP no lipidadas como se describe en la tabla 14. Se administraron vacunas a las 0, 4 y 9 semanas. Se analizaron muestras séricas de conejo recogidas de las semanas 0 y 10 por SBA frente a las cepas con secuencias de fHBP homólogas y heterólogas. La tabla 14 muestra el porcentaje de respondedores después de la tercera inmunización. Una semana después de la tercera inmunización (semana 10), todas las muestras séricas mostraron actividad bactericida frente a las cepas homólogas así como  
35 frente a otras cepas de prueba de la misma subfamilia de fHBP. En general los sueros pre-extraídos de conejo no

mostraron actividad bactericida preexistente frente a las cepas sometidas a prueba.

**Tabla 14: Porcentaje de respondedores de postdosis tres en conejos New Zealand White vacunados con fHBP no lipidada recombinante**

MnB fHBP	Dosis/0,5 ml	AlPO <sub>4</sub> /0,5 ml	n	B09	B16	B24	B44	A05	A12	A22
A05	100 mcg	0,25 mg	5					100	80	100
A12	100 mcg	0,25 mg	5					100	100	100
A22	100 mcg	0,25 mg	5					80	80	80
B09	100 mcg	0,25 mg	5	100	80	60	80			
B22	100 mcg	0,25 mg	5	40	100	60	100			
B44	100 mcg	0,25 mg	5	0	60	40	100			
A05, A12, B22, B44	100 mcg cada uno/400 mcg total	0,25 mg	5	100	100	60	100	100	100	100
<b>Proteínas fHBP de MnB usadas</b>										
A05	SEQ ID NO: 13, en la que la Cys en la posición 1 está deletada, o SEQ ID NO: 55 codificada por SEQ ID NO: 54									
A12	SEQ ID NO: 14, en la que la Cys en la posición 1 está deletada									
A22	SEQ ID NO: 15, en la que la Cys en la posición 1 está deletada									
B09	SEQ ID NO: 18, en la que la Cys en la posición 1 está deletada, o SEQ ID NO: 49, codificada por SEQ ID NO: 48.									
B22	SEQ ID NO: 19, en la que la Cys en la posición 1 está deletada									
B44	SEQ ID NO: 21, en la que la Cys en la posición 1 está deletada, o SEQ ID NO: 44 codificada por SEQ ID NO: 51									
<b>Variantes de prueba en la tabla 14:</b>										
B09 (SEQ ID NO: 18)	B16 (SEQ ID NO: 60)	B24 (SEQ ID NO: 20)	B44 (SEQ ID NO: 21)	A05 (SEQ ID NO: 13)	A12 (SEQ ID NO: 14)	A22 (SEQ ID NO: 15)				

5 La invención también proporciona las siguientes realizaciones tal como se definen en las cláusulas siguientes:

C1. Una composición inmunógena que comprende un polipéptido P2086, en el que P2086 es una variante B44, una B02, una B03, una B22, una B24, una B09, una A05, una A04, una A12 o una A22.

C2. Una composición inmunógena que comprende un polipéptido P2086 de la subfamilia B, en la que el polipéptido P2086 de la subfamilia B es una variante B44, una B02, una B03, una B22, una B24 o una B09.

10 C3. La composición inmunógena de C2 que comprende además un polipéptido P2086 de la subfamilia A.

C4. La composición inmunógena de C3, en la que el polipéptido P2086 de la subfamilia A es una variante A05, una A04, una A12 o una A22.

C5. La composición inmunógena de una cualquiera de las cláusulas C1-4, en la que la composición además comprende un adyuvante.

15 C6. La composición inmunógena de C5, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un adyuvante de aluminio;
- b) una saponina
- c) una secuencia de nucleótidos CpG; y
- d) cualquier combinación de a), b) y c).

20 C7. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C6, en la que el adyuvante de aluminio se selecciona del grupo que consiste en AlPO<sub>4</sub>, Al(OH)<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> y alumbre.

C8. La composición inmunógena de acuerdo con las cláusulas C6 o C7, en la que la concentración de aluminio

- está entre aproximadamente 0,125 µg/ml y 0,5 µg/ml.
- 5 C9. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C8, en la que la concentración de aluminio es de 0,25 µg/ml.
- C10. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C6-9, en la que la concentración de saponina está entre 1 µg/ml y 250 µg/ml.
- 10 C11. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C10, en la que la concentración de saponina está entre 10 µg/ml y 100 µg/ml.
- C12. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C10, en la que la concentración de saponina es de 10 µg/ml.
- 15 C13. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C10, en la que la concentración de saponina es de 100 µg/ml.
- C14. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C6-13, en la que la saponina es QS-21 o ISCOMATRIX.
- 20 C15. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C1-C14, en la que la composición confiere la capacidad de producir una respuesta inmunógena a la bacteria *Neisseria meningitidis* tras la administración de múltiples dosis a un sujeto.
- C16. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C15, en la que la respuesta inmunógena a bacteria *Neisseria meningitidis* se confiere tras la administración de 2 dosis al sujeto.
- 25 C17. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C15, en la que la respuesta inmunógena a bacteria *Neisseria meningitidis* se confiere tras la administración de 3 dosis al sujeto.
- C18. Una composición que confiere un incremento de la inmunogenicidad de un antígeno P2086 no lipidado, en el que la composición comprende una saponina y al menos un antígeno P2086 no lipidado.
- 30 C19. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C18, en la que la concentración de saponina está entre 1 µg/ml y 250 µg/ml.
- C20. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C19, en la que la concentración de saponina está entre 10 µg/ml y 100 µg/ml.
- 35 C21. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C19, en la que la concentración de saponina es de 10 µg/ml.
- C22. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C19, en la que la concentración de saponina es de 100 µg/ml.
- 40 C23. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C18-22, en la que la saponina es QS-21 o ISCOMATRIX.
- C24. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C18-23, que además comprende aluminio.
- 45 C25. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C24, en la que la concentración de aluminio está entre 0,125 µg/ml y 0,5 µg/ml.
- C26. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C25, en la que la concentración de aluminio es de 0,25 µg/ml.
- 50 C27. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C18-26, en la que la composición confiere una respuesta inmunógena a bacterias *Neisseria meningitidis* tras la administración de múltiples dosis a un sujeto.
- C28. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C27, en la que la respuesta inmunógena a las bacterias *Neisseria meningitidis* se confiere tras la administración de 2 dosis al sujeto.
- 55 C29. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C27, en la que la respuesta inmunógena a las bacterias *Neisseria meningitidis* se confiere tras la administración de 3 dosis al sujeto.
- C30. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C18-29, en la que el antígeno P2086 no lipidado es un polipéptido P2086 de la subfamilia B no lipidado.
- 60 C31. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C30, en la que el polipéptido de P2086 de la subfamilia B no lipidado es una variante B44, una B02, una B03, una B22, una B24 o una B09.
- C32. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C18-29, en la que el antígeno P2086 no lipidado es un polipéptido de P2086 de la subfamilia A no lipidado.
- 65 C33. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C32, en la que el polipéptido P2086 de la subfamilia A no lipidado es una variante A05, una A04, una A12 o una A22.
- C34. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C18-33, en la que la composición comprende al menos dos antígenos P2086 no lipidados, en la que los dos antígenos P2086 no lipidados son al menos un polipéptido P2086 de la subfamilia A no lipidado y al menos un polipéptido P2086 de la subfamilia B no lipidado.
- C35. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C34, en la que el polipéptido P2086 de la subfamilia A no lipidado es una variante A05 y el polipéptido P2086 de la subfamilia B no lipidado es una variante B44.
- 60 C36. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C34, en la que el polipéptido P2086 de la subfamilia A no lipidado es una variante A05 y el polipéptido P2086 de la subfamilia B no lipidado es una variante B22.
- 65 C37. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula C34, en la que el polipéptido P2086 de la subfamilia A no lipidado es una variante A05 y el polipéptido P2086 de la subfamilia B no lipidado es una variante

B09.

C38. Un procedimiento para conferir inmunidad a un sujeto contra una bacteria *Neisseria meningitidis*, en el que el procedimiento comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunógena que comprende un polipéptido de P2086 de la subfamilia B, en el que el polipéptido de P2086 de la subfamilia B es una variante B44, una B02, una B03, una B22, una B24 o una B09.

C39. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C38, en el que la composición inmunógena comprende además un polipéptido P2086 de la subfamilia A.

C40. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C39, en la que el polipéptido P2086 de la subfamilia A es una variante A05, una A04, una A12 o una A22.

C41. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C38-40, que comprende además un adyuvante.

C42. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C41, en el que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un adyuvante de aluminio;
- b) una saponina
- c) una secuencia de nucleótidos CpG; y
- d) cualquier combinación de a), b) y c).

C43. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C42, en el que el adyuvante de aluminio se selecciona del grupo que consiste en  $AlPO_4$ ,  $Al(OH)_3$ ,  $Al_2(SO_4)_3$  y alumbre.

C44. El procedimiento de acuerdo con las cláusulas C42 o 43, en el que la concentración de aluminio está entre 0,125  $\mu g/ml$  y 0,5  $\mu g/ml$ .

C45. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C44, en el que la concentración de aluminio es de 0,25  $\mu g/ml$ .

C46. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C42-45, en el que la concentración de saponina está entre 1  $\mu g/ml$  y 250  $\mu g/ml$ .

C47. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C46, en el que la concentración de saponina está entre 10  $\mu g/ml$  y 100  $\mu g/ml$ .

C48. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C47, en el que la concentración de saponina es de 10  $\mu g/ml$ .

C49. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C48, en el que la concentración de saponina es de 100  $\mu g/ml$ .

C50. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C42-49, en el que la saponina es QS-21 o ISCOMATRIX.

C51. El procedimiento de acuerdo con las cláusulas C38-50, en el que la composición inmunógena se administra al sujeto en múltiples dosis en un programa de dosificación.

C52. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C51, en el que la composición inmunógena se administra al sujeto en 2 dosis en un programa de dosificación.

C53. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C51, en el que la composición inmunógena se administra al sujeto en 3 dosis en un programa de dosificación.

C54. Un procedimiento para producir un polipéptido de P2086 no lipidado variante que comprende las etapas de:

- a) clonar la secuencia de ácido nucleico de la variante de ORF2086 en un vector de expresión de *E. coli*;
- b) transformar las bacterias con el vector de expresión ORF2086;
- c) inducir la expresión; y
- d) aislar la proteína P2086 expresada;

en la que el vector de expresión ORF2086 no comprende una secuencia de control de la lipidación.

C55. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C54, en el que el codón que codifica la Cys en N-terminal de la variante de ORF2086 está delecionado.

C56. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C54, en el que el codón que codifica la Cys en N-terminal de la variante de ORF2086 está mutado para generar un codón de Ala, Gly o Val.

C57. El procedimiento de acuerdo con las cláusulas C54 o 56, en el que la variante de ORF2086 es una variante A05, B01, o B44.

C58. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C54-57, en el que la cola N-terminal está mutada para añadir residuos de Ser y Gly para extender el tallo Gly/Ser inmediatamente aguas abajo de la Cys en N-terminal.

C59. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C58, en el que el número total de los residuos de Gly y Ser en el tallo Gly/Ser es al menos 7.

C60. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C58, en el que el número total de los residuos de Gly y Ser en el tallo Gly/Ser es al menos 8.

C61. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C58, en el que el número total de los residuos de Gly y Ser en el tallo Gly/Ser es al menos 9.

C62. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C58, en el que el número total de los residuos de Gly y Ser en el tallo Gly/Ser es al menos 10.

C63. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C58, en el que el número total de los residuos de Gly y Ser en el tallo Gly/Ser es al menos 11.

C64. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C58, en el que el número total de los residuos de Gly y Ser en

el tallo Gly/Ser es al menos 12.

C65. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones C54-57, en el que los codones de la cola N-terminal de la variante de ORF2086 se optimizan mediante mutagénesis puntual de modo que el codón que codifica el quinto aminoácido de la variante de ORF2086 es 100 % idéntico a los nucleótidos 13-15 de la SEQ ID NO: 8 y el codón que codifica el aminoácido trece de la variante de ORF2086 es 100 % idéntico a los nucleótidos 37-39 de la SEQ ID NO: 8.

C66. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C65, en el que los codones de la cola N-terminal de la variante de ORF2086 son 100 % idénticos a los nucleótidos 1-45 de la SEQ ID NO: 8.

C67. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C65, en el que los codones de la cola N-terminal de la variante de ORF2086 son 100 % idénticos a los nucleótidos 4-45 de la SEQ ID NO: 8.

C68. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C65, en el que los codones de la cola N-terminal de la variante de ORF2086 son 100 % idénticos a los nucleótidos 4-42 de la SEQ ID NO: 8.

C69. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C65, en el que la cola N-terminal de la proteína codificada por la variante de ORF2086 comprende al menos una sustitución de aminoácido en comparación con los aminoácidos 1-15 de la SEQ ID NO: 18.

C70. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C65, en el que la cola N-terminal de la proteína codificada por la variante de ORF2086 comprende al menos una sustitución de aminoácido en comparación con los aminoácidos 2-15 de la SEQ ID NO: 18.

C71. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C65, en el que la cola N-terminal de la proteína codificada por la variante de ORF2086 comprende dos sustituciones de aminoácido en comparación con los aminoácidos 1-15 de la SEQ ID NO: 18.

C72. El procedimiento de acuerdo con la cláusula C65, en el que la cola N-terminal de la proteína codificada por la variante de ORF2086 comprende dos sustituciones de aminoácido en comparación con los aminoácidos 2-15 de la SEQ ID NO: 18.

C73. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones C69-72, en el que las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras.

C74. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C65-73, en el que la variante de ORF2086 es una variante A22 o B22.

C75. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C55-74, en el que la expresión se induce mediante la adición de IPTG.

C76. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas C55-75, en el que la bacteria es *E. coli*.

C77. Una composición que comprende un polipéptido ORF2086 no lipídado no piruvilado aislado.

C78. La composición de C77, en la que la composición es inmunógena.

C79. La composición de C77, en la que el polipéptido comprende una delección de una Cys en N-terminal en comparación con el correspondiente polipéptido ORF2086 no lipídado de tipo silvestre.

C80. La composición de C77, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21, en la que la cisteína en la posición 1 se deleciona.

C81. La composición de C80, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 55.

C82. La composición de C77, en la que el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que está unida operativamente a un sistema de expresión, en el que dicho sistema de expresión es capaz de ser expresado en una célula bacteriana.

C83. La composición de C82, en la que el sistema de expresión es un sistema de expresión de plásmido.

C84. La composición de C82, en la que la célula bacteriana es una célula *E. coli*.

C85. La composición de C82, en la que la secuencia de nucleótidos está unida a una secuencia reguladora que controla la expresión de dicha secuencia de nucleótidos.

C86. La composición de C77, en la que el polipéptido comprende una sustitución de Cys en N-terminal en comparación con el correspondiente polipéptido ORF2086 no lipídado de tipo silvestre.

C87. Una composición que comprende un polipéptido ORF2086 no lipídado que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende expresar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21, en la que se deleciona la cisteína en la posición 1, en la que la secuencia de nucleótidos está unida de manera operativa a un sistema de expresión que es capaz de ser expresado en una célula bacteriana.

C88. La composición de C87, en la que la célula bacteriana es *E. coli*.

C89. Una composición que comprende un polipéptido aislado, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID N.º 49, y un polipéptido aislado, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID N.º 44.

C90. La composición de acuerdo con cualquiera de C77-C89, en la que la composición es inmunógena.

C91. La composición de C90, que comprende adicionalmente un polipéptido ORF2086 de la subfamilia A del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

C92. La composición de acuerdo con cualquiera de C77-C89, en donde la composición induce una respuesta inmunológica bactericida en un mamífero frente a un polipéptido ORF2086 de la subfamilia B del serogrupo B de

*Neisseria meningitidis*.

- C93. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 49.  
 C94. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la SEQ ID NO: 46.  
 C95. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la SEQ ID NO: 47.  
 5 C96. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la SEQ ID NO: 48.  
 C97. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 50.  
 C98. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende la SEQ ID NO: 45.  
 C99. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 44.  
 C100. Un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la  
 10 SEC ID N.º 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 48 y la SEQ ID NO: 45, en donde el plásmido es capaz de ser  
 expresado en una célula bacteriana.  
 C101. El plásmido de C100, en el que la célula bacteriana es *E. coli*.  
 C102. Un procedimiento de inducir anticuerpos bactericidas específicos para un ORF2086 de subfamilia B  
 serogrupo B de *Neisseria meningitidis* en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad  
 15 eficaz de un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que  
 consiste en la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 49, o una combinación de las mismas.  
 C103. Un procedimiento para producir un polipéptido que comprende expresar en una célula bacteriana un  
 polipéptido que comprende una secuencia que tiene más del 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 21,  
 comprendiendo dicha secuencia al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos  
 20 13-18 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 21-34 de la SEQ ID NO: 21, y los aminoácidos 70-80 de la SEQ ID  
 NO: 21, o una combinación de los mismos, en la que la secuencia carece de una cisteína en N-terminal; y  
 purificar el polipéptido.  
 C104. El procedimiento de la reivindicación C102, en donde la secuencia comprende adicionalmente al menos  
 25 un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 96-116 de la SEQ ID NO: 21, los  
 aminoácidos 158-170 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 172-185 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 187-  
 199 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 213-224 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 226-237 de la SEC ID  
 N.º 21, los aminoácidos 239-248 de la SEQ ID NO: 21 o una combinación de los mismos.  
 C105. El procedimiento de 104, en el que la célula bacteriana es *E. coli*.  
 C106. Un polipéptido aislado producido por un procedimiento que comprende el procedimiento de C104.  
 30 C107. Una composición inmunógena producida por un procedimiento que comprende el procedimiento de C104.  
 C108. Una composición inmunógena que comprende un polipéptido ORF2086 de la subfamilia B del serogrupo B  
 de *Neisseria meningitidis*, en el que el polipéptido es B44 no lipidado no piruvilado.  
 C109. La composición de C108, que comprende adicionalmente un segundo polipéptido ORF2086 de la  
 subfamilia B del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, en el que el segundo polipéptido es B09 no lipidado no  
 35 piruvilado.  
 C110. La composición de C108, en la que dicha composición comprende no más de 3 polipéptidos ORF2086 de  
 la subfamilia B.  
 C111. La composición de C108, en la que dicha composición comprende no más de 2 polipéptidos ORF2086 de  
 la subfamilia B.  
 40 C112. La composición de C108, en la que dicha composición comprende un polipéptido ORF2086 de la  
 subfamilia B.  
 C113. La composición de C112, en la que dicha composición comprende un polipéptido A05 de la subfamilia A.

## LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> WYETH LLC ADNerson, Annaliesa S. Hoiseth, Susan K. Jansen, Kathrin U. Ruppen, Mark E. Moran,  
 Justin K.  
 <120> VARIANTES NO LIPIDADAS DE ANTÍGENOS ORF2086 DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*  
 <130> PC063885  
 50 <150> US61/381837  
 <151> 10-09-2010  
 <160> 64  
 55 <170> PatentIn versión 3.4  
 <210> 1  
 <211> 780  
 60 <212> ADN  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 1

ES 2 728 282 T3

tgcagcagcg gaggcggagg cggcgggtgc gccgccgaca tcggcacggg gcttgccgat 60  
gcactaactg cgccgctcga ccataaagac aaaggtttga aatccctgac attggaagac 120  
tocattcccc aaaacggaac actgaccctg tcggcacaag gtgoggaaaa aactttcaaa 180  
gccggcgaca aagacaacag cctcaacacg ggcaaaactga agaacgacaa aatcagccgc 240  
ttcgacttcg tgcaaaaaat cgaagtggac ggacaaacca tcacactggc aagcggcgaa 300  
tttcaaatat acaaacagga ccaactccgc gtcgttgccc tacagattga aaaaatcaac 360  
aaccocgaca aaatcgacag cctgataaac caacgctcct tccttgtcag cggtttgggc 420  
ggagaacata ccgccttcaa ccaactgccc ggcgacaaag ccgagtatca cggcaaagca 480  
ttcagctcgc acgatgcccg cggaaaaactg acctatacca tagattttgc cgccaaacag 540  
ggacacggca aaatcgaaca cctgaaaaca ccogagcaaa atgtcgagct tgccgcccgc 600  
gaactcaaag cagatgaaaa atcacacgcc gtcattttgg gogacacgcg ctacggcagc 660  
gaagaaaaag gcacttacca cctcgcctt ttcggcgacc gcgcccaaga aatcgccggc 720  
tcggcaaccg tgaagatagg ggaaaagggt cacgaaatcg gcatcgccgg caaacagtag 780

<210> 2  
<211> 786  
5 <212> ADN  
<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
<400> 2

10 tgcagcagcg gaagcggag cggaggcggc ggtgtcgccg ccgacatcgg cacagggctt 60  
gccgatgcac taactgogcc gctcgaccat aaagacaaag gtttgaatc cctgacattg 120  
gaagactcca tttcccaaaa cggaacactg acctgtcgg cacaaggtgc ggaaaaaact 180  
ttcaaagtcg gcgacaaaga caacagtctc aatacaggca aattgaagaa cgacaaaatc 240  
agccgcttcg actttgtgca aaaaatcgaa gtggacggac aaaccatcac gctggcaagc 300  
ggcgaatttc aaatatacaa acaggaccac tccgccgctg ttgcctaca gattgaaaaa 360  
atcaacaacc ccgacaaaat cgacagcctg ataaaccaac gctccttctt tgtcagcggc 420  
ttgggcggag aacataccgc cttcaaccaa ctgccagcg gcaaagccga gtatcacggc 480  
aaagcattca gctccgacga tgccggcgga aaactgacct ataccataga ttttgccgcc 540  
aaacagggac acggcaaaat cgaacacctg aaaacacccg agcagaatgt cgagcttgcc 600  
tccgccgaac tcaaagcaga tgaaaaatca cacgocgta ttttgggoga cacgogctac 660  
ggcagcgaag aaaaaggcac ttaccacctc gctcttttcg gcgaccgagc ccaagaaatc 720  
gccggctcgg caaccgtgaa gataagggaa aaggttcacg aaatcggeat ccgocggcaaa 780  
cagtag 786



ES 2 728 282 T3

5 <210> 3  
 <211> 765  
 <212> ADN  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 3

tgcagcagcg gaggcggcgg tgctgcgcgc gacatcggcg cggggccttg c gatgcacta 60  
 accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtott tgacgctgga tcagtcctgc 120  
 aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgocg aaaaaactta tggaaacggc 180  
 gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttoga ctttatccgt 240  
 caaatcgaag tggacggaca aaccatcacg ctggcaagcg gcgaatttca aatatacaaa 300  
 cagaaccact ccgcctcgt tgccctacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc 360  
 gacagcctga taaaccaacg ctcttctctt gtcagcgggt tgggocggaga acataccgcc 420  
 ttcaaccaac tgctgacgg caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgac 480  
 ccgaacggca ggctgcacta ctccattgat ttaccaaaa aacagggta cggcagaatc 540  
 gaacacctga aaacgccga gcagaatgct gagcttgcct ccgccgaact caaagcagat 600  
 gaaaaatcac acgcctcat tttgggcgac acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggcact 660  
 taccacctcg cccttttcgg cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag 720  
 ataagggaaa aggttcacga aatcggcatc gccggcaaac agtag 765

10 <210> 4  
 <211> 765  
 <212> ADN  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

15 <400> 4

tgcagcagcg gagggggcgg tgtcgccgcc gacattggtg cggggcttgc cgatgcacta 60  
accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtcogtc 120  
aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaaocggc 180  
gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggcca gccgcttcga ctttatccgt 240  
caaatcgaag tggacggaca aaccatcacg ctggcaagcg gcgaatttca aatatacaaa 300  
cagaaccact ccgccgtcgt tgcctacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc 360  
gacagcctga taaaccaacg ctccctcctt gtcagcgggtt tgggaggaga acataccgcc 420  
ttcaaccaac tgcctgacgg caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgac 480  
ccgaacggca ggctgcacta ctccattgat tttacaaaa aacaggggta cggcagaatc 540  
gaacacctga aaacgccga gcagaatgac gagcttgctt ccgccgaact caaagcagat 600  
gaaaaatcac acgccgtcat tttggggcag acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggcact 660  
taccacctcg cccttttcgg cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag 720  
ataaggaaa aggttcacga aatcggcatc gccggcaaac agtag 765

<210> 5  
<211> 765  
<212> ADN  
<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 5

tgcagcagcg gagggcggcg tgtcgccgcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcacta 60  
accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtcogtc 120  
aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaaocggc 180  
gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggcca gccgcttcga ctttatccgt 240  
caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca aatatacaaa 300  
caggaccact ccgccgtcgt tgcctacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc 360  
gacagcctga taaaccaacg ctccctcctt gtcagcgggtt tgggtggaga acataccgcc 420  
ttcaaccaac tgcccagcgg caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgat 480  
gctggcggaa aactgaccta taccatagat ttccgccca aacagggaca cggcaaaatc 540  
gaacacttga aaacaccga gcaaaatgac gagcttgctt ccgccgaact caaagcagat 600  
gaaaaatcac acgccgtcat tttggggcag acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggcact 660  
taccacctcg cccttttcgg cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag 720  
ataaggaaa aggttcacga aatcggcatc gccggcaaac agtag 765

10

<210> 6

ES 2 728 282 T3

<211> 792  
 <212> ADN  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5 <400> 6

```

tgcagcagcg gaggcggcgg aagcggaggc ggcggtgtcg ccgccgacat cggcgcgggg      60
cttgccgatg cactaaccgc accgctcgac cataaagaca aaggtttgaa atccctgaca      120
ttggaagact ccatttocca aaacggaaca ctgaccctgt cggcacaagg tgcggaaga      180
actttcaaag ccggcgacaa agacaacagt ctcaacacag gcaaactgaa gaacgacaaa      240
atcagccgct togactttat ccgtcaaatc gaagtggacg ggcagctcat taccttgag      300
agcggagagt tccaagtgta caaacaaga cattccgcct taaccgccct tcagaccgag      360
caagtacaag actcggagca ttccgggaag atggttgcca aacgccagtt cagaatcggc      420
gacatagtgg gcgaacatac atcttttgac aagcttocca aagacgtcat ggcgacatat      480
cgcgggacgg cgttcgggtc agacgatgcc ggcggaaaac tgacctacac catagatttc      540
gccgccaagc agggacacgg caaaatcgaa catttgaaat cgcctgaact caatgttgac      600
ctggccgccg ccgatatcaa gccggatgaa aaacaccatg ccgtcatcag cggttccgtc      660
ctttacaacc aagccgagaa aggcagttac tctctaggca tctttggcgg gcaagcccag      720
gaagttgccg gcagcgcgga agtggaaacc gcaaaccgca tacgccatat cggctctgcc      780
gccaagcaat aa                                                                792
    
```

10 <210> 7  
 <211> 768  
 <212> ADN  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

15 <400> 7

tgcagcagcg gagggggcgg tgtcgccgcc gacatcgggc cggggcttgc cgatgcaacta 60  
accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtcogtc 120  
aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgocg aaaaaactta tggaaacggc 180  
gacagcctta atacgggcaa attgaagaac gacaaggcca gccgcttoga ctttatccgt 240  
caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa 300  
caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag aacaagatcc agagcattcc 360  
gggaagatgg ttgcgaaacg ccggttcaaa atcggcgaca tagcggggca acatacatct 420  
tttgacaagc ttcccaaaga cgtcatggcg acatategcg ggacggcggt cggttcagac 480  
gatgcccggc gaaaactgac ctatactata gattttgctg ccaaacaggg acacggcaaa 540  
atcgaacatt tgaaatcgcc cgaactcaat gtcgagcttg ccaccgcta tatcaagccg 600  
gatgaaaaac accatgccgt catcagcggc tccgtccttt acaatcaaga cgagaaagcg 660  
agttactccc tcggtatctt tggcgggcaa gccaggaag ttgccggcag cgcggaagtg 720  
gaaaccgcaa accgcataca ccatatcggc cttgcggcca agcaataa 768

<210> 8  
<211> 768  
<212> ADN  
<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 8

tgcagcagcg gagggggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcaacta 60  
accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt taacgctgga tcagtcogtc 120  
aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgocg aaaaaactta tggaaacggc 180  
gacagcctta atacgggcaa attgaagaac gacaaggcca gccgcttoga ctttatccgt 240  
caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa 300  
caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag tacaagactc ggaggattcc 360  
gggaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga atcggcgaca tagcggggca acatacatct 420  
tttgacaagc ttcccaaagg cggcagtgcg acatategcg ggacggcggt cggttcagac 480  
gatgctggcg gaaaactgac ctatactata gatttcgocg ccaagcaggg acacggcaaa 540  
atcgaacatt tgaaatcgcc cgaactcaat gtcgagcttg ccaccgcta tatcaagccg 600  
gatgaaaaac gccatgccgt tatcagcggc tccgtccttt acaaccaaga cgagaaagcg 660  
agttactccc tcggtatctt tggcgggcaa gccaggaag ttgccggcag cgcggaagtg 720  
gaaaccgcaa accgcataca ccatatcggc cttgcggcca agcagtaa 768

10

<210> 9

ES 2 728 282 T3

<211> 768  
 <212> ADN  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 9

```

tgcagcagcg gaggcggcgg tgtcgccggc gacatggcgg cggtgcttgc cgatgcacta      60
accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc      120
aggaaaaacg agaaaactgaa gctggcggca caaggtgogg aaaaaactta tggaaacggc      180
gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttoga ctttatccgt      240
caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa      300
caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag tacaagattc ggagcattca      360
gggaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga atcggcgata tagcgggtga acatacatct      420
tttgacaagc ttcccgaagg cggcagggcg acatatcgcg ggacggcatt cggttcagac      480
gatgccagtg gaaaactgac ctacaccata gatttogccg ccaagcaggg acacggcaaa      540
atcgaacatt tgaaatcgcc agaactcaat gttgacctgg ccgctccga tatcaagccg      600
gataaaaaac gccatgccgt catcagcggg tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaggc      660
agttactctc taggcattct tggcggggcaa gccccaggaag ttgccggcag cgcagaagtg      720
gaaaccgcaa accggcatacg ccatatcggt cttgccgcca agcagtaa      768
    
```

10

<210> 10  
 <211> 768  
 <212> ADN  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

15

<400> 10

tgcagcagcg gagggggtgg tgtogccgcc gacatcgggtg cggggcttgc cgatgcacta 60  
accgcaccgc tgcaccataa agacaaaggt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120  
aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggt 180  
gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gcogtttoga ctttatccgc 240  
caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagtg gagagttcca agtatacaaa 300  
caaagccatt cgccttaac cgcctttcag accgagcaaa tacaagattc ggagcattcc 360  
gggaagatgg ttgcgaaaac ccagttcaga atcggcgaca tagcgggcca acatacatct 420  
tttgacaagc ttcccgaagg cggcagggcg acatatcgcg ggacggcgtt cggttcagac 480  
gatgccggcg gaaaactgac ctacaccata gatttcgccg ccaagcaggg aaacggcaaa 540  
atcgaacatt tgaatcgcg agaactcaat gtcgacctgg ccgcgcgcca tatcaagccg 600  
gatggaaaac gccatgcogt catcagcggg tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaggc 660  
agttactccc tcggtatott tggcggaaaa gccaggaag ttgccggcag cgcggaagtg 720  
aaaaccgtaa accgcatacgc ccatatcggc cttgccgcca agcaataa 768

<210> 11

<211> 792

<212> ADN

<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

<400> 11

tgcagcagcg gaggcggcgg aagcggagge ggcgggtgtcg ccgccgacat cggcgcgggg 60  
cttgccgatg cactaaccgc accgctcgac cataaagaca aaggtttgaa atccctgaca 120  
ttggaagact ccatttcca aaacggaaca ctgacctgt cggcacaagg tgcggaaaga 180  
actttcaaag ccggcgacaa agacaacagt ctcaacacag gcaaaactgaa gaacgacaaa 240  
atcagccgct tcgactttat ccgtcaaate gaagtggacg ggcagctcat taccttgag 300  
agcggagagt tccaagtgt caaacaagc cattccgct taaccgcoct tcagaccgag 360  
caagtacaag actcggagca ttccgggaag atggttgcga aacgccagtt cagaatcggc 420  
gacatagtgg gcgaacatac atcttttggc aagcttcca aagacgtcat ggcgacatat 480  
cgcgggacgg cgttcggttc agacgatgcc ggcggaaaac tgacctacac catagatttc 540  
gccccaagc agggacacgg caaaatogaa ctttgaaat cgcagaact caatgttgac 600  
ctggccgccc ccgatatcaa gccggatgaa aaacaccatg ccgtcatcag cgttccgctc 660  
ctttacaacc aagccgagaa aggcagttac tototaggca tctttggcgg gcaagcccag 720  
gaagttgccg gcagcgcgga agtggaaacc gcaaaccgca tacgccatat cggctttgcc 780  
gccaagcaat aa 792

5

10

ES 2 728 282 T3

<210> 12  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 12

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Thr  
 1 5 10 15

Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly  
 20 25 30

Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn Gly Thr Leu  
 35 40 45

Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala Gly Asp Lys  
 50 55 60

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

Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu  
 85 90 95

Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val  
 100 105 110

Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu  
 115 120 125

Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr  
 130 135 140

Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Asp Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala  
 145 150 155 160

Phe Ser Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe  
 165 170 175

Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu

ES 2 728 282 T3

180 185 190

Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser  
 195 200 205

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

Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly  
 225 230 235 240

Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala  
 245 250 255

Gly Lys Gln

<210> 13  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 13

5

Cys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile  
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp  
 20 25 30

Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn Gly  
 35 40 45

Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Val Gly  
 50 55 60

Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile  
 85 90 95

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

Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp  
 115 120 125

Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu

10



ES 2 728 282 T3

130		135		140															
His	Thr	Ala	Phe	Asn	Gln	Leu	Pro	Ser	Gly	Lys	Ala	Glu	Tyr	His	Gly				
145					150					155					160				
	Lys	Ala	Phe	Ser	Ser	Asp	Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile			
				165						170					175				
	Asp	Phe	Ala	Ala	Lys	Gln	Gly	His	Gly	Lys	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Thr			
				180					185					190					
	Pro	Glu	Gln	Asn	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Asp	Glu			
			195					200					205						
	Lys	Ser	His	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Gly	Ser	Glu	Glu			
	210					215						220							
	Lys	Gly	Thr	Tyr	His	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	Asp	Arg	Ala	Gln	Glu	Ile			
	225					230					235					240			
	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Arg	Glu	Lys	Val	His	Glu	Ile	Gly			
				245						250					255				
	Ile	Ala	Gly	Lys	Gln														
				260															

<210> 14  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 14

ES 2 728 282 T3

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln  
 20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60

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

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe

ES 2 728 282 T3

85 90 95

Gln Ile Tyr Lys Gln Asn His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu  
100 105 110

Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser  
115 120 125

Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu  
130 135 140

Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp  
145 150 155 160

Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly  
165 170 175

Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu  
180 185 190

Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu  
195 200 205

Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala  
210 215 220

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

Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln  
245 250

<210> 15  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 15

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln  
20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn

5

10

ES 2 728 282 T3

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

<210> 16  
 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 16

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp  
 1 5 10 15

Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys

10

ES 2 728 282 T3

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

<210> 17  
 <211> 255  
 <212> PRT

ES 2 728 282 T3

<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

<400> 17

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln  
 20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60

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

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 85 90 95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu  
 100 105 110

Gln Glu Gln Asp Pro Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Arg  
 115 120 125

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

Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp  
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln  
 165 170 175

Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Glu  
 180 185 190

Leu Ala Thr Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys His His Ala Val Ile  
 195 200 205

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

ES 2 728 282 T3

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val  
 225 230 235 240

Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245 250 255

<210> 18  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 18

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln  
 20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60

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

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

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu  
 100 105 110

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

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

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

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln  
 165 170 175

Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Glu  
 180 185 190

10

ES 2 728 282 T3

Leu Ala Thr Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys Arg His Ala Val Ile  
 195 200 205

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

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val  
 225 230 235 240

Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245 250 255

<210> 19

<211> 255

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

<400> 19

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Val Leu  
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln  
 20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60

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

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 85 90 95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu  
 100 105 110

Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln  
 115 120 125

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

Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp  
 145 150 155 160

5

10



ES 2 728 282 T3

Asp Ala Ser Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln  
 165 170 175

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

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

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu  
 210 215 220

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val  
 225 230 235 240

Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245 250 255

<210> 20  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 20

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln  
 20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60

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

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 85 90 95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu  
 100 105 110

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

10

ES 2 728 282 T3

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

Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp  
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln  
 165 170 175

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

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

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu  
 210 215 220

Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val  
 225 230 235 240

Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245 250 255

<210> 21  
 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 21

ES 2 728 282 T3

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp  
1 5 10 15

Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys  
20 25 30

Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn  
35 40 45

Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Arg Thr Phe Lys Ala  
50 55 60

Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys  
65 70 75 80

Ile Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu  
85 90 95

ES 2 728 282 T3

Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser  
 100 105 110

Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser  
 115 120 125

Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Val Gly  
 130 135 140

Glu His Thr Ser Phe Gly Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr  
 145 150 155 160

Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr  
 165 170 175

Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu  
 180 185 190

Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro  
 195 200 205

Asp Glu Lys His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln  
 210 215 220

Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln  
 225 230 235 240

Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His  
 245 250 255

Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 260

- 5 <210> 22
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
  
- 10 <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos sintética: Cebador directo
  
- <400> 22
- tgccatatga gcagcggaag cggaag 26
  
- 15 <210> 23
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Artificial
  
- 20 <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos sintética: Cebador inverso

<400> 23  
 cggatccccta ctgtttgccg gcgatgc 27

5 <210> 24  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética: Cebador directo

<400> 24  
 ttcttcccg ggaaggagat atacatatgt gcagcagcgg aggcggcgg 49

15 <210> 25  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética: Cebador inverso

<400> 25  
 ttcttgctc agcattattg ctggcggca agaccgat 38

25 <210> 26  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética: Cebador directo

<400> 26  
 ttcttcccg ggaaggagat atacatatga gcagcggagg cggcgg 46

35 <210> 27  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética: Cebador inverso

<400> 27  
 ttcttgctc agcattattg ctggcggca agaccgat 38

45 <210> 28  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética

<400> 28  
 atgagctctg gaggtggagg aagcgggggc ggtgga 36

55 <210> 29  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

65

ES 2 728 282 T3

<400> 29  
**Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly**  
**1 5 10**

5  
 <210> 30  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10  
 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética

<400> 30  
 atgagctctg gaagcgggaag cgggggcggt gga 33

15  
 <210> 31  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 31  
**Met Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly**  
**1 5 10**

25  
 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30  
 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética

35  
 <400> 32  
 atgagctctg gaggtggagg a 21

40  
 <210> 33  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

45  
 <400> 33  
**Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly**  
**1 5**

50  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética

55  
 <400> 34  
 atgagcagcg ggggcggtgg a 21

ES 2 728 282 T3

5  
 <210> 35  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 35  
 Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro  
 20 25  
 10  
 <210> 36  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 36  
 15  
 Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro  
 20 25  
 20  
 <210> 37  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 37  
 Cys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro  
 20 25  
 25  
 <210> 38  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 38  
 Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro  
 20  
 35  
 <210> 39  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 39  
 40

ES 2 728 282 T3

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Val Leu  
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro  
20

5 <210> 40  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

10 <400> 40

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro  
20

15 <210> 41  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (15)..(15)  
<223> X es G o V

25 <400> 41

Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Xaa  
1 5 10 15

30 <210> 42  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Secuencia de nucleótidos sintética

<400> 42  
atgagcagcg gaggcggcgg tgtcggccc gacatcggcg cgggg 45

40 <210> 43  
<211> 789  
<212> ADN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Secuencia de nucleótidos sintética

50 <400> 43



ES 2 728 282 T3

```

agctctggag gtggaggaag cgggggcggt ggagttgcag cagacattgg agcaggatta      60
gcagatgcac tgacggcacc gttggatcat aaagacaaag gcttgaaatc gcttacotta      120
gaagattcta tttcacaaaa tggcaccctt accttgtccg cgcaaggcgc tgaacgtact      180
tttaaagccg gtgacaaaga taatagctta aatacaggta aactcaaaaa tgataaaatc      240
tcgcgttttg atttcattcg tcaaatcgaa gtagatggcc aacttattac attagaaagc      300
ggtgaattcc aagtatataa acaatcccat tcagcactta cagcattgoa aaccgaacag      360
gtccaagact cagaacattc cggcaaaatg gtagctaaac gtcaattccg catcggtgac      420
attgtcggtg aacatacaag cttcggaaaa ttaccaaaag atgtgatggc gacctatcgc      480
ggtacggcat ttggatcaga tgatgcagge ggtaaattaa cttatacaat tgactttgca      540
gcaaaaacaag gacatggcaa aattgaacat ttaaaatctc ccgaacttaa cgtagatctc      600
gcagcagcag atattaaacc agatgaaaaa caccacgcag tcatttcagg ttcagtttta      660
tacaatcagg cagaaaaagg ttcgtactct ttaggtattt ttggogggga agctcaagaa      720
gttgcaggta ggcgagaagt agaaacggca aatggcattc gtcacattgg gttagcggcg      780
aaacaataa                                     789

```

<210> 44  
 <211> 262  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 44

```

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile
 1           5           10           15

```

ES 2 728 282 T3

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

ES 2 728 282 T3

<210> 45  
 <211> 780  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos artificial

10

<400> 45

```

agctctggag gtggaggaag cgggggcggt ggagttgcag cagacattgg agcaggatta      60
gcagatgcac tgacggcacc gttggatcat aaagacaaag gcttgcagtc gcttacctta      120
gatcagtctg tcaggaaaaa tgagaaactt aagttggcgg cgcaaggcgc tgaaaaaact      180
tatggaaacg gtgacagctt aaatacaggt aaactcaaaa atgataaagt ctgcggtttt      240
gatttcattc gtcaaatcga agtagatggc aagottatta cattagaaag cgggtgaattc      300
caagtatata aacaatccca ttcagcactt acagcattgc aaaccgaaca ggtccaagac      360
tcagaagatt cgggcaaaat ggtagctaaa cgtcaattcc gcatcgggtga cattgcgggt      420
gaacatacaa gcttcgacaa attaccaaaa gggggcagtg cgacctatcg cggtagcgga      480
tttgatcag atgatgcagg cggtaaatta acttatacaa ttgactttgc agcaaaacaa      540
ggacatggca aaattgaaca tttaaaatct cccgaactta acgtagagct cgcaaccgca      600
tatattaaac cagatgaaaa acgccacgca gtcatttcag gttcagtttt atacaatcag      660
gacgaaaaag gttcgtactc tttaggtatt tttggcgggc aagctcaaga agttgcaggt      720
agcgcagaag tagaaacggc aaatggcatt caccacattg ggtagcggc gaaacaataa      780
  
```

15

<210> 46  
 <211> 765  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos artificial

<400> 46

ES 2 728 282 T3

agctctggag gtggaggagt tgcagcagac attggagcag gattagcaga tgcactgacg 60  
 gcaccgttgg atcataaaga caaaggottg cagtcgctta ccttagatca gtctgtcagg 120  
 aaaaatgaga aacttaagtt ggcggcgcaa ggcgctgaaa aaacttatgg aaacggtgac 180  
 agcttaaata caggtaaact caaaaatgat aaagtctcgc gttttgattt cattcgtcaa 240  
 atcgaagtag atggcaagct tattacatta gaaagcggtg aattccaagt atataaacia 300  
 tcccattcag cacttacagc attgcaaacc gaacaggctc aagactcaga agattccggc 360  
 aaaatggtag ctaaacgtca attccgcacg ggtgacattg cgggtgaaca tacaagcttc 420  
 gacaaattac caaaaggcgg cagtgcgacc tatcgggta cggcatttgg atcagatgat 480  
  
 gcaggcggta aattaactta tacaattgac tttgcagcaa aacaaggaca tggcaaaatt 540  
 gaacatttaa aatctccga acttaacgta gagctcgcga ccgcatatat taaaccagat 600  
 gaaaaacgcc acgcagtcac ttcaggttca gttttataca atcaggacga aaaaggttcg 660  
 tactctttag gtatTTTTGG cgggcaagct caagaagttg caggtagcgc agaagtagaa 720  
 acggcaaattg gcattcacca cattgggtta ggcgcgaaac aataa 765

<210> 47  
 <211> 765  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos artificial

10

<400> 47

ES 2 728 282 T3

agcagcgggg gcggtggagt tgcagcagac attggagcag gattagcaga tgcactgacg 60  
 gcaccgttgg atcataaaga caaaggcttg cagtcgctta ccttagatca gtctgtcagg 120  
 aaaaatgaga aacttaagtt ggcggcgcaa ggcgctgaaa aaacttatgg aaacggtgac 180  
 agcttaaata caggtaaact caaaaatgat aaagtctcgc gttttgattt cattcgtcaa 240  
 atcgaagtag atggcaagot tattacatta gaaagcggtg aattccaagt atataaacia 300  
 tcccattcag cacttacagc attgcaaacc gaacaggctc aagactcaga agattccggc 360  
 aaaatggtag ctaaacgtca attcgcgcatc ggtgacattg cgggtgaaca tacaagcttc 420  
 gacaaattac caaaaggcgg cagtgcgacc tatcgcggta cggcatttgg atcagatgat 480  
 gcaggcggta aattaactta tacaattgac tttgcagcaa aacaaggaca tggcaaaatt 540  
 gaacatttaa aatctccgga acttaacgta gagctcgcga ccgcatatat taaaccagat 600  
 gaaaaacgcc acgcagtcac ttcaggttca gttttataca atcaggacga aaaaggttcg 660  
 tactctttag gtatTTTTGG cgggcaagct caagaagttg caggtagcgc agaagtagaa 720  
 acggcaaatg gcattcacca cattgggtta ggcggcgaac aataa 765

<210> 48  
 <211> 765  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos artificial

10

<400> 48

agcagcggag ggggcgggtg cgcgcggcag atcgggtgagg ggcttgccga tgcactaacc 60  
 gcaccgctcg accataaaga caaaggtttg cagtctttaa cactggatca gtccgtcagg 120  
 aaaaacgaga aactgaagct ggcggcacia ggtgcggaaa aaacttatgg aaacggcgac 180  
 agccttaata cgggcaaat gaagaacgac aaggtcagcc gcttgcactt tatcgtcaa 240  
 atcgaagtgg acgggaagct cattaccttg gagagcggag agttccaagt gtacaaacia 300  
 agccattccg ccttaaccgc ccttcagacc gagcaagtac aagactcga ggattccggg 360  
 aagatggttg cgaaacgcca gttcagaatc ggcgacatag cgggcgaaca tacatctttt 420  
 gacaagcttc ccaaaggcgg cagtgcgaca tatcgcggga cggcgttcgg ttcagacgat 480  
 gctggcggaa aactgacctt tactatagat ttgcgcgcca agcagggaca cggcaaaatc 540  
 gaacatttga aatgcgccga actcaatgtc gagottgoca ccgcctatat caagcgggat 600  
 gaaaaacgcc atgccgttat cagcggttcc gtcctttaca accaagacga gaaaggcagt 660  
 tactccctcg gtatctttgg cgggcaagcc caggaagttg ccggcagcgc ggaagtggaa 720  
 accgcaaacg gcatacacca tatcggcttt gccgcgaagc agtaa 765

ES 2 728 282 T3

5 <210> 49  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

10 <400> 49

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala  
 1 5 10 15

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

Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala  
 35 40 45

Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr  
 50 55 60

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

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

Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln  
 100 105 110

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

ES 2 728 282 T3

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

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

Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly  
 165 170 175

His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Glu Leu  
 180 185 190

Ala Thr Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys Arg His Ala Val Ile Ser  
 195 200 205

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

Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu  
 225 230 235 240

Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245 250

<210> 50  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

10

<400> 50

ES 2 728 282 T3

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile  
1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp  
20 25 30

Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu  
35 40 45

Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly  
50 55 60

Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe  
65 70 75 80

Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Lys Leu Ile Thr Leu Glu



ES 2 728 282 T3

				85					90					95			
Ser	Gly	Glu	Phe	Gln	Val	Tyr	Lys	Gln	Ser	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala		
			100					105					110				
Leu	Gln	Thr	Glu	Gln	Val	Gln	Asp	Ser	Glu	Asp	Ser	Gly	Lys	Met	Val		
		115					120					125					
Ala	Lys	Arg	Gln	Phe	Arg	Ile	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Glu	His	Thr	Ser		
	130					135					140						
Phe	Asp	Lys	Leu	Pro	Lys	Gly	Gly	Ser	Ala	Thr	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala		
145					150					155					160		
Phe	Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Asp	Phe		
			165						170					175			
Ala	Ala	Lys	Gln	Gly	His	Gly	Lys	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Ser	Pro	Glu		
			180					185					190				
Leu	Asn	Val	Glu	Leu	Ala	Thr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Pro	Asp	Glu	Lys	Arg		
		195					200					205					
His	Ala	Val	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Gln	Asp	Glu	Lys	Gly		
	210					215					220						
Ser	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Gln	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Gly		
225					230					235					240		
Ser	Ala	Glu	Val	Glu	Thr	Ala	Asn	Gly	Ile	His	His	Ile	Gly	Leu	Ala		
				245					250					255			
Ala Lys Gln																	

<210> 51  
 <211> 789  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos artificial

10

<400> 51

ES 2 728 282 T3

agcagcggag gcggcggaag cggaggcggc ggtgtcgccg ccgacatcgg cgcggggcctt 60  
 gccgatgcac taaccgcacc gctcgacat aaagacaaag gtttgaaatc cctgacattg 120  
 gaagactcca ttcccaaaa cggaaactg accotgtcgg cacaaggtgc ggaaagaact 180  
 ttcaaagccg gcgacaaaga caacagtctc aacacaggca aactgaagaa cgacaaaatc 240  
 agccgcttcg actttatccg tcaaatojaa gtggacgggc agctcattac cttggagagc 300  
 ggagagttcc aagtgtacaa acaaagccat tccgcotta cgcoccttca gaccgagcaa 360  
 gtacaagact cggagcattc cgggaagatg gttgcgaaac gccagttcag aatcggcgac 420  
 atagtgggcg aacatacatc ttttgcaag cttcccaaag acgtcatggc gacatatcgc 480  
 gggacggcgt tcggttcaga cgatgccggc ggaaaactga cctacaccat agatttcgcc 540  
 gccaaagcagg gacacggcaa aatcgaacat ttgaaatcgc cagaactcaa tgttgacctg 600  
 gccgccgccc atatcaagcc ggatgaaaaa caccatgccg tcatcagcgg ttccgtcctt 660  
 tacaaccaag ccgagaaagg cagttactct ctaggcacatc ttggcgggca agcccaggaa 720  
 gttgccggca gcgcggaagt ggaaaccgca aacggcatac gccatatcgg tcttgccgcc 780  
 aagcaataa 789

5 <210> 52  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos artificial

<400> 52  
 atgagcagcg gaggcggcgg tgcgccgc gacatcggcg cggtg 45

15 <210> 53  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos artificial

<400> 53  
 atgagcagcg gagggggcgg tgcgccgc gacatcggcg cgggg 45

25 <210> 54  
 <211> 783  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos artificial

<400> 54

ES 2 728 282 T3

```

agcagcggaa gcggaagcgg aggcggcggg gtcgccgccg acatcggcac agggcttgcc      60
gatgactaa  ctgcccggct cgaccataaa gacaaagggt tgaaatccct gacattggaa      120
gactccattt cccaaaacgg aacactgacc ctgtcggcac aagggtcggg aaaaactttc      180
aaagtccggc acaaagacaa cagtctcaat acaggcaaat tgaagaacga caaaatcagc      240
cgcttogact ttgtgcaaaa aatcgaagtg gacggacaaa ccatcacgct ggcaagcggc      300
gaatttcaaa tatacaaaaca ggaccactcc gccgtcgttg cctacagat tgaaaaaatc      360
aacaaccccg acaaaatcga cagcctgata aaccaacgct ccttccttgt cagcggtttg      420
ggcgggagaa atacccgctt caaccaactg cccagcggca aagccgagta tcacggcaaa      480
gcattcagct ccgacgatgc cggcggaaaa ctgacctata ccatagattt tgccgccaaa      540
cagggacacg gcaaaatcga acacctgaaa acacccgagc agaatgtcga gcttgcttcc      600
gccgaactca aagcagatga aaaatcacac gccgtcattt tgggcgacac gcgctacggc      660
agcgaagaaa aaggcactta ccacctcgtc cttttcggcg accgagccca agaaatcgcc      720
ggctcggcaa ccgtgaagat aagggaaaag gttcacgaaa tcggcatcgc cggcaaacag      780
tag                                                                 783

```

5

<210> 55  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial  
 <400> 55

ES 2 728 282 T3

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

ES 2 728 282 T3

Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His  
 130 135 140

Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys  
 145 150 155 160

Ala Phe Ser Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp  
 165 170 175

Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro  
 180 185 190

Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys  
 195 200 205

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

Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala  
 225 230 235 240

Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile  
 245 250 255

Ala Gly Lys Gln  
 260

5 <210> 56  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial  
 <400> 56

Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5

15 <210> 57  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial  
 <400> 57

25 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Ala Asp Ile  
 1 5 10 15

ES 2 728 282 T3

Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp  
 20 25 30

Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn Gly  
 35 40 45

Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly  
 50 55 60

Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe  
 65 70 75 80

Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu  
 85 90 95

Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala  
 100 105 110

Leu Gln Thr Glu Gln Glu Gln Asp Pro Glu His Ser Glu Lys Met Val  
 115 120 125

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

Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala  
 145 150 155 160

Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe  
 165 170 175

Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu  
 180 185 190

Leu Asn Val Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys His  
 195 200 205

His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys Gly  
 210 215 220

Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Glu Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly  
 225 230 235 240

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

Ala Lys Gln

ES 2 728 282 T3

<210> 58  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

5

<400> 58

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Ala Asp  
 1 5 10 15

Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys  
 20 25 30

Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn  
 35 40 45

Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn  
 50 55 60

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

Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu  
 85 90 95

Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr  
 100 105 110

Ala Leu Gln Thr Glu Gln Glu Gln Asp Pro Glu His Ser Glu Lys Met  
 115 120 125

Val Ala Lys Arg Arg Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr  
 130 135 140

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

Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp  
 165 170 175

Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro  
 180 185 190

Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys  
 195 200 205

His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys  
 210 215 220

ES 2 728 282 T3

Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Glu Lys Ala Gln Glu Val Ala  
 225 230 235 240

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

Ala Ala Lys Gln  
 260

<210> 59  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 59

5

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln  
 20 25 30

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

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60

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

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 85 90 95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu  
 100 105 110

Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln  
 115 120 125

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

Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Ser Ser Asp  
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Ile Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln  
 165 170 175

10



ES 2 728 282 T3

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

Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Glu Lys His His Ala Val Ile  
 195 200 205

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu  
 210 215 220

Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val  
 225 230 235 240

Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245 250 255

5 <210> 60  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)  
 <400> 60

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln  
 20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60

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

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 85 90 95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu  
 100 105 110

Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln  
 115 120 125

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

10

ES 2 728 282 T3

Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp  
 145 150 155 160

Asp Ala Ser Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln  
 165 170 175

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

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

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu  
 210 215 220

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val  
 225 230 235 240

Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245 250 255

<210> 61  
 <211> 768  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de ácidos nucleicos artificial

10

<400> 61

ggcagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggtgcttgc cgatgcacta 60  
 accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtcctgc 120  
 aggaaaaacg agaaaactgaa gctggcggca caaggtgcgy aaaaaactta tggaaacggc 180  
 gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttoga ctttatccgt 240  
 caaatogaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagtcca agtgtacaaa 300  
 caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag tacaagattc ggagcattca 360  
 gggaaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga atcggcgata tagcgggtga acatacatct 420  
 tttgacaagc ttcccgaagg cggcagggcg acatatcgcg ggacggcatt cggttcagac 480  
 gatgccagtg gaaaactgac ctacaccata gatttcgcoy ccaagcaggg acacggcaaa 540  
 atcgaacatt tgaaatgcc agaactcaat gttgacctg cogcctcoga tatcaagccg 600  
 gataaaaaac gccatgccgt catcagcgtt tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaggc 660  
 agttactctc taggcatctt tggcgggcaa gccaggaag ttgccggcag cgcagaagtg 720

**gaaaccgcaa acggcatacg ccatatcggg ttgcccga agcagtaa**

**768**

5 <210> 62  
<211> 255  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Secuencia de aminoácidos artificial  
<400> 62

ES 2 728 282 T3

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

ES 2 728 282 T3

<211> 765  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de ácidos nucleicos artificial

<400> 63

```

ggcagcagcg gagggggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcacta      60
accgcaccgc togaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtcogtc      120
aggaaaaacg agaaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc      180
gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgottcga ctttatcogt      240
caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca aatatacaaa      300
caggaccact ccgcogtctg tgcctacag attgaaaaaa tcaacaacc cgcacaaatc      360
gacagcctga taaaccaacg ctcttcctt gtcagcgggt tgggtggaga acataccgcc      420
ttcaaccaac tgccocagcg caaagcogag tatcacggca aagcattcag ctccgacgat      480
gctggcggaa aactgacota taccatagat ttcgccgcca aacagggaca cggcaaaatc      540
gaacacttga aaacaccoga gcaaaatgtc gagcttgcct ccgccgaact caaagcagat      600
gaaaaatcac acgcogtcat tttgggcgac acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggcact      660
taccacctcg cccttttcgg cgaccgggcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag      720
ataagggaaa aggttcacga aatcggcatc gccggcaaac agtaa                          765
    
```

10  
 15 <210> 64  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 64

```

Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1           5           10           15
    
```

ES 2 728 282 T3

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln  
 20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60

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

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 85 90 95

Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu  
 100 105 110

Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser  
 115 120 125

Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu  
 130 135 140

Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp  
 145 150 155 160

Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly  
 165 170 175

His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu  
 180 185 190

Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu  
 195 200 205

Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala  
 210 215 220

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

Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln  
 245 250

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un polipéptido ORF2086 no lipidado no piruvilado aislado en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19, en la que la cisteína en la posición 1 se deletiona.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que está unida operativamente a un sistema de expresión, en el que dicho sistema de expresión es capaz de ser expresado en una célula bacteriana.
- 10 3. La composición de la reivindicación 2, en la que el sistema de expresión es un sistema de expresión de plásmido en el que la célula bacteriana es una célula de *E. coli*, o en la que la secuencia de nucleótidos está unida a una secuencia reguladora que controla la expresión de dicha secuencia de nucleótidos.
- 15 4. Una composición que comprende un polipéptido ORF2086 no lipidado no piruvilado que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende expresar la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, en la que la cisteína en la posición 1 está deletionada, en la que la secuencia de nucleótidos está operativamente unida a un sistema de expresión que es capaz de expresarse en una célula bacteriana.
- 20 5. La composición de la reivindicación 4, en la que la célula bacteriana es *E. coli*.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la composición es inmunógena.
- 25 7. La composición de la reivindicación 6, que además comprende un polipéptido ORF2086 de la subfamilia A del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.
8. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en la que la composición induce una respuesta inmunológica bactericida en un mamífero frente a un polipéptido ORF2086 de la subfamilia B del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.
- 30 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso como un medicamento.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso como una vacuna.

# FIG. 1A

## Secuencias de ácidos nucleicos de las variantes de P2086 no lipidadas

> Secuencia de ácido nucleico de la variante A04 (SEQ ID NO: 1)  
 TGACAGCGGAGGGGAGGGGGTGTGCGCCGGACATCGGCACGGGGCTTGCCGATGCACTAACTGCGCCGCTCGACC  
 AATAAGACAAAAGGTTTGAATCCCTGACATGGAAAGACTCCAT'CCCCAAAACGGAAACACTGACCCCTGTGGCACAAGGTGC  
 GGAAAAAATTTCAAAGCCGGCACAAGACACAGCTCAACACGGGCAAACTGAAGAACGACAAAAATCAGCCGCTTCGAC  
 TTCGTGCAAAAAAATCGAAGTGGACGGACAAAACCATCACACTGGCAAGCGGGAATTTCAAATATACAAAACAGGACCCTCCG  
 CCGTCGTTGCCCTACAGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAAATCGACAGCTGATAAACCAACGCTCCCTTCCTTGTCCAG  
 CGGTTTGGCGGAGAACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCGGACAAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAAGCTCCGAC  
 GATGCCGGGGAAAAACTGACCTATACCATAGATTTTGGCCCAAAACAGGGACACGGCAAAAATCGAACACCTGAAAAACACCCG  
 AGCAAAATGTCGAGCTTGGCCGCGGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCGCTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGG  
 CAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCCCTTTTGGCGACCGCCCAAGAAAATCGCCGGCTCGGCAACCCGTGAAGATA  
 GGGAAAAGGTTCACGAAAATCGGCATCGCCGGCAAAACAGTAG

> Secuencia de ácido nucleico de la variante A05 (SEQ ID NO: 2)  
 TGACAGCGGGAAGCGGAAGCGGAGGGGGTGTGCGCCGGACATCGGCACAGGGCTTGCCGATGCACTAACTGCGCCG  
 TCGACCATAAAGACAAAAGGTTTGAATCCCTGACATGGAAAGACTCCATTTCCCAAAAACGGAAACACTGACCCCTGTCCGCACA  
 AGGTGGGAAAAAATTTCAAAGTGGCGACAAGACAACAGTCTCAATACAGGCAAAATGAAAGAACGCAAAAATCAGCCCG  
 TTCGACTTGTGCAAAAAAATCGAAGTGGACGGACAAAACCATCACGCTGGCAAGCGGGAATTTCAAATATACAAAACAGGACC  
 ACTCCGCGCTCGTTGCCCTACAGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCTGATAAACCAACGCTCCCTCCCT  
 TGT'CAAGCGGTTTGGCGGAGAACATACCGCCTTCAAACCAACTGCCCGCAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATT'CAAGC  
 TCCGACGATGCCGGGGAAAAACTGACCTATACCATAGATTTTGGCCCAAAACAGGGACACGGCAAAAATCGAACACCTGAAAA  
 CACCCGAGCAGAATGTCGAGCTTGCCTCCGCGCAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCGCTCATTTTGGGCGACACGCG  
 CTACGGCAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCTCTTTTGGCGACCGCCCAAGAAAATCGCCGGCTCGGCAACCCGTG  
 AAGATAAGGGAAAAAGGTTCACGAAAATCGGCATCGCCGGCAAAACAGTAG



**FIG. 1B**

```

> Secuencia de ácido nucleico de la variante A12 (SEQ ID NO: 3)
TGCAGCAGCGGAGGGCGGTGTCCGCCCGGACATCGGGCGGGGCTTGCCGATGCACATAACCGCACCCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCCGTAAGGAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAAATTGAAGAAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGACAAAACCATCAGCTGGCAAGCGGGAATTTCAAATATACAAACAGAACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCTTGTAGCGGTTTGGCGGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCAGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGACCCGAAACGGCAGG
CTGCACTACTCCATTGATTTTACCAAAAACAGGGTTACGGCAGAAATCGAAACACCTGAAAAACGCCCGAGCAGAAATGTCGAGC
TTGCCCTCCGCCGAAC TCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCA TTTTGGCGGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGGCCCAAGAAAATCGCCGGCTCGGCAACCCGTGAAGATAAGGAAAAAGGTTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAAACAGTAG

> Secuencia de ácido nucleico de la variante A12-2 (SEQ ID NO: 4)
TGCAGCAGCGGAGGGCGGTGTCCGCCCGGACATGGTGGGGGCTTGCCGATGCACATAACCGCACCCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCCGTAAGGAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAAATTGAAGAAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGACAAAACCATCAGCTGGCAAGCGGGAATTTCAAATATACAAACAGAACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCTTGTAGCGGTTTGGCGGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCAGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGACCCGAAACGGCAGG
CTGCACTACTCCATTGATTTTACCAAAAACAGGGTTACGGCAGAAATCGAAACACCTGAAAAACGCCCGAGCAGAAATGTCGAGC
TTGCCCTCCGCCGAAC TCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCA TTTTGGCGGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGGCCCAAGAAAATCGCCGGCTCGGCAACCCGTGAAGATAAGGAAAAAGGTTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAAACAGTAG

```

**FIG. 1C**

> Secuencia de ácido nucleico de la variante A22 (SEQ ID NO: 5)  
 TGCAGCAGCGGAGGGCGGTGTCCGCCCGACATCGGCGGGGGCTTGCCGATGCACATAACCGCACCGCTCGACCATAAAG  
 ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTACGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA  
 AACTTATGGAACCGGCACAGCCTCAATACGGGCAAAATTGAAGAACGACAAGGTCAAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC  
 GAAGTGGACGGGCAGTCAATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAATAATACAACAAGGACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC  
 AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCTTGTCAAGCGGTTTGGGTGGAGA  
 ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCCAGCGCAAGCCGAGTATCACGGCAAGCATTCAGCTCCGACGATGCTGGCGGAAAA  
 CTGACCTATACCATAGATTTCCGCCCAACACAGGGACACCGGCAAAATCGAACACTTGAAAAACACCCGAGCAAAATGTCGAGC  
 TTGCCTCCGCCGAACTCAAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGCGACACGCGCTACGGCGGGAAGAAAAAGG  
 CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCCTGAAGATAAGGGAAAAAGGTTCCAC  
 GAAATCGGCATCGCCGGCAAAACAGTAG

> Secuencia de ácido nucleico de la variante B02 (SEQ ID NO: 6)  
 TGCAGCAGCGGAGGGCGGGAAGCGGAGGGCGGTGTCCGCCCGACATCGGCGGGGGCTTGCCGATGCACATAACCGCAC  
 CGCTCGACCATAAAGACAAAAGTTTGAATCCCTGACATTTGAAAGACTCCATTTCCCAAAAACGGAAACACTGACCCCTGTGGGC  
 ACAAGGTGGGAAAAGAACTTTCAAAGCCGGCCACAAAAGACAACAGTCTCACACACAGGCAAACTGAAGAACGACAAAAATCAGC  
 CGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGCAGCTCATTTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAAGTGTACAAAACAAA  
 GCCATTCGGCCTTAACCGCCTTCAGACCCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGCATTCGGGAAAGATGGTTGCGAAAACGCCAGTT  
 CAGAAATCGGCGACATAGTGGCGGAACATACATCTTTTACAAGCTTCCCAAGACTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCGG  
 TTCGGTTCAGACGATGCCGGGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTCCCGCCAAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAAACATTT  
 TGAAATCGCCCTGAACTCAATGTGACCTGGCCGGCCCGATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTTCATCAGCGGTTTC  
 CGTCCCTTACAACCAAGCCGAAAGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTTGGCGGGCAAGCCCAAGAAAGTTGCCGGCAGCGCGG  
 GAAGTGGAAACCGCAACCGCATACGCCATATCGGTCTTGGCCGCAAGCAATAA

**FIG. 1D**

> Secuencia de ácido nucleico de la variante B03 (SEQ ID NO: 7)  
TGCAGCAGCGGAGGGGGGTGTGCGCCCGGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCCGCTCGACCATAAAG  
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTGAGGAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA  
AACTTATGAAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAAATTGAAGAACGACAAGGTCAAGCTTTCGACTTATCCGTCAAAATC  
GAAGTGGACGGCAGCTCATTAACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCTAAGTGTACAAAACAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC  
AGACCGAGCAAGAACAAAGATCCAGAGCATTCGGGGAAGATGGTTGCGAAAACGCCGGTTCAAAAATCGGGACATAGCGGGCGGA  
ACATAACATCTTTGACAAAGCTTCCCAAAGACGTGATGGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTGAGACGATGCCGGCGGA  
AAACTGACCTATACTATAGATTTTGTGCTGCCAAACAGGACACGGCAAAAATCGAAACAATTTGAAAATCGCCCCGAACTCAATGTCTG  
AGCTTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTGATCAGGGTTCCTTACAAATCAAGACGAGAA  
AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGGCAAGCCAGGAAAGTTGCCGGCAGCGGAAAGTGGAAAACCGCAAAACGGGCATA  
CACCATATCGGTCTTTGCCGCCAAGCAATAA

> Secuencia de ácido nucleico de la variante B09 (SEQ ID NO: 8)  
TGCAGCAGCGGAGGGGGGTGTGCGCCCGGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCCGCTCGACCATAAAG  
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTAAGCTGGATCAGTCCGTGAGGAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA  
AACTTATGAAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAAATTGAAGAACGACAAGGTCAAGCTTTCGACTTATCCGTCAAAATC  
GAAGTGGACGGGAGCTCATTAACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCTAAGTGTACAAAACAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC  
AGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGGATTCGGGGAAGATGGTTGCGAAAACGCCAGTTGAGAAATCGGGACATAGCGGGCGGA  
ACATAACATCTTTGACAAAGCTTCCCAAAGCGCAGTGGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTGAGACGATGCTGGCGGA  
AAACTGACCTATACTATAGATTTGCGCCCAAGCAGGACACGGCAAAAATCGAAACAATTTGAAAATCGCCCCGAACTCAATGTCTG  
AGCTTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACCCATGCCGTGATCAGGGTTCCTTACAAATCAAGACGAGAA  
AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGGCAAGCCAGGAAAGTTGCCGGCAGCGGAAAGTGGAAAACCGCAAAACGGGCATA  
CACCATATCGGTCTTTGCCGCCAAGCAATAA

**FIG. 1E**

> Secuencia de ácido nucleico de la variante B22 (SEQ ID NO: 9)  
 TGCAGCAGCGGAGGGCGGTGTGCGCCGCCGACATCGCGCGGTGCTTGCCGATGCACATAACCGCACCGCTCGACCATAAAG  
 ACAAAAGTTTGCAAGTTTGACGCTGGATCAGTCCGTGAGGAAAAACGAGAAACTGAAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA  
 AACTTATGGAACGGGCAGCCCTCAATACGGGCAATTTGAAGAACGACAAGTTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC  
 GAAATGGACGGGCAGCTCATTAACCTTGGAGAGCGGAGAGTCCAAAGTGTACAAAACAAAGCCATTCGGCCTTAACCGCCCTTC  
 AGACCGAGCAAGTACAAGATTCCGAGCATTCAGGGAAGATGGTTCCGAAAACGCCAGTTCAGAAATCGGCGATATAGCGGGTGA  
 ACATACATCTTTTGACAAAGCTTCCCGAAGGGCGCACATATCGCGGACGGCATTCGGTTTCAGACGATGCCAGTGGGA  
 AAATGACCTACACCATAGATTTCCCGCCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTTG  
 ACCTGGCCGCTCCGATATCAAGCCGGATAAAAAACGCCATGCCGTTCATCAGCGGTTCCGTCTTTACAACCAAGCCGAGAA  
 AGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCAGGAAAGTTGCCGGCAGCGCAGAAAGTGGAAAACCGCAAAACGGGCATA  
 CGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

> Secuencia de ácido nucleico de la variante B24 (SEQ ID NO: 10)  
 TGCAGCAGCGGAGGGGTGGTGTGCGCCGCCGACATCGGTGCGGGCTTGCCGATGCACATAACCGCACCGCTCGACCATAAAG  
 ACAAAAGTTTGCAAGTTTGACGCTGGATCAGTCCGTGAGGAAAAACGAGAAACTGAAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA  
 AACTTATGGAACGGTGACAGCCCTCAATACGGGCAAAATTTGAAGAACGACAAGTTCAGCCGTTTCGACTTTATCCGCCAAATC  
 GAAATGGACGGGCAGCTCATTAACCTTGGAGAGTGGAGAGTCCAAAGTGTACAAAACAAAGCCATTCGGCCTTAACCGCCCTTC  
 AGACCGAGCAAAATACAAGATTCCGAGCATTCGGGAAAGATGGTTCCGAAAACGCCAGTTCAGAAATCGGCGACATAGCGGGCGGA  
 ACATACATCTTTTGACAAAGCTTCCCGAAGGGCGCACATATCGCGGACGGCGTTCGGTTTCAGACGATGCCGGCGGA  
 AAATGACCTACACCATAGATTTCCCGCCCAAGCAGGGAAACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTTG  
 ACCTGGCCGCTCCGATATCAAGCCGGATGAAAACGCCATGCCGTTCATCAGCGGTTCCGTCTTTACAACCAAGCCGAGAA  
 AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGAAAAAGCCAGGAAAGTTGCCGGCAGCGCGGAAAGTGGAAAACCGTAAACGGGCATA  
 CGCCATATCGGCCTTGCCGCCAAGCAATAA

**FIG. 1F**

> Secuencia de ácido nucleico de la variante B44 (SEQ ID NO: 11)

```

TGCAGCAGCGGAGCGGCGGAAAGCGGAGCGGCGGTGTCCCGCCGACATCGGCGCGGGCTTGCCGATGCACATAACCCGAC
CGCTCGACCATAAAGACAAAAGGTTTGAATCCCTGACATGGAAAGACTCCATTTCCCAAAAACGGAACACTGACCCCTGTCCGGC
ACAAGGTGCGGAAAAGAACTTTCAAAGCCGGCGACAAGACAAACAGTCTCAACACACAGGCAAACTGAAGAACGACAAAAATCAGC
CGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAATGGACGGGCAGCTCATTACCCTGGAGCGGAGAGTCCAAAGTGTACAAAACAAA
GCCATCCGCCCTTAACCGCCCTTCAGACCCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGCATTCGGGGAAGATGGTTGCCAAAACGCCAGTT
CAGAATCGGCGACATAGTGGCGAACATACATCTTTTGGCAAGCTTCCCAAAAGACTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCG
TTCCGGTTCAGACGATGCCGGCGGAAAACGTGACCTACACCATAGATTTCCGCGCCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTT
TGAAATCGCCAGAACTCAATGTTGACCTGGCCCGCCCGATATCAAGCCGGATGAAAAACACCCATGCCGTTCATCAGCGGTTTC
CGTCCCTTACAAACCAAGCCGAGAAAGGCAAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAAGAAAGTTGCCGGCAGCGCG
GAAGTGGAAAACCCGCAACGGCCATACGCCATATCGGTCTTGGCCCAAGCAATAA

```

## FIG. 2A

### Secuencias de aminoácidos de variantes de P2086 no lipidadas

- > Secuencia de aminoácidos de la variante A04 (SEQ ID NO: 12)  
CSSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFD  
 FVQKIEVDGQTTILASGEFQIYKQDHSVAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGDKAEYHGKAFSSD  
 DAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKI  
 GEKVHEIGIAGKQ
  
- > Secuencia de aminoácidos de la variante de A05 (SEQ ID NO: 13)  
CSSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTTLTSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISR  
 FDFVQKIEVDGQTTILASGEFQIYKQDHSVAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFS  
 SDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATV  
 KIREKVHEIGIAGKQ
  
- > Secuencia de aminoácidos de la variante de A12 (SEQ ID NO: 14)  
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKAAQGAEKTYGNNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQI  
 EVDGQTTILASGEFQIYKQHSVAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGR  
 LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVVKIREKVH  
 EIGIAGKQ
  
- > Secuencia de aminoácidos de la variante de A22 (SEQ ID NO: 15)  
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKAAQGAEKTYGNNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQI  
 EVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGK  
 LTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAEELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVVKIREKVH  
 EIGIAGKQ

**FIG. 2B**

- > Secuencia de aminoácidos de la variante B02 (SEQ ID NO: 16)  
 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLEDSISQNGTILLSAQAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKIS  
 RFD~~FIRQ~~IEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFDKLPKDVMATYRGTA  
 FGSDDAGGKLT~~YTI~~DFAAKQGHGKIEHLKSP~~ELNVD~~LAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSA  
 EVETANGIRHIGLAAKQ
- > Secuencia de aminoácidos de la variante B03 (SEQ ID NO: 17)  
 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGN~~GD~~SLNTGKLNKDKVSRFD~~FIRQ~~I  
 EVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSGKMVAKR~~R~~FKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTAFGSDDAGG  
 KLT~~YTI~~DFAAKQGHGKIEHLKSP~~ELNVEL~~ATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAE~~VE~~TANGI  
 HHIGLAAKQ
- > Secuencia de aminoácidos de la variante B09 (SEQ ID NO: 18)  
 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGN~~GD~~SLNTGKLNKDKVSRFD~~FIRQ~~I  
 EVDGK~~LIT~~LESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGG  
 KLT~~YTI~~DFAAKQGHGKIEHLKSP~~ELNVEL~~ATAYIKPDEKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAE~~VE~~TANGI  
 HHIGLAAKQ
- > Secuencia de aminoácidos de la variante B22 (SEQ ID NO: 19)  
 CSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKLSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGN~~GD~~SLNTGKLNKDKVSRFD~~FIRQ~~I  
 EVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLP~~EGGR~~ATYRGTAFGSDDASG  
 KLT~~YTI~~DFAAKQGHGKIEHLKSP~~ELNVD~~LAASDIKPKRRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAE~~VE~~TANGI  
 RHIGLAAKQ

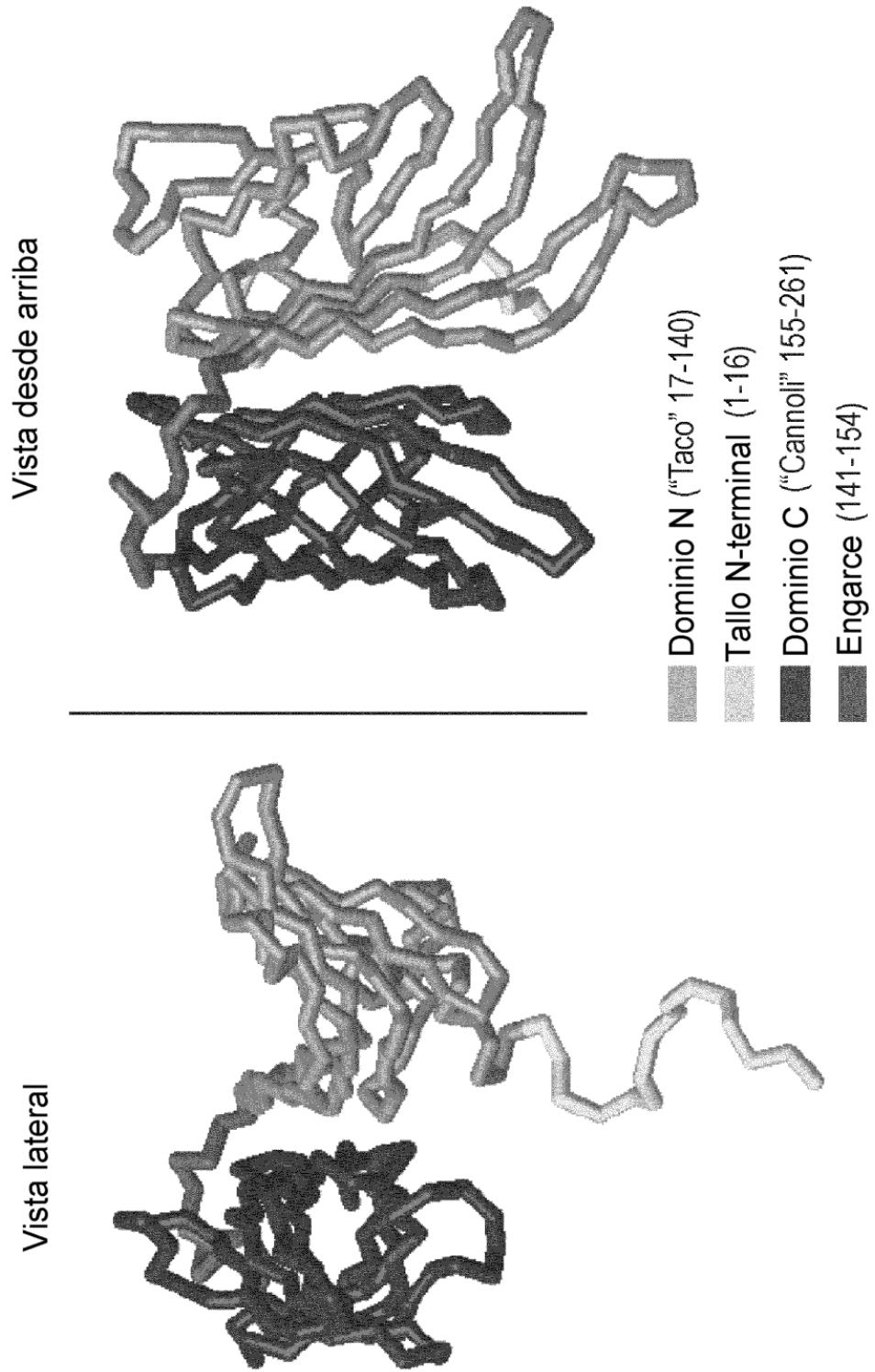
**FIG. 2C**

> Secuencia de aminoácidos de la variante B24 (SEQ ID NO: 20)  
 CSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQLTLDQSVRKNEKCLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQI  
 EVDGQLITLLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGG  
 KLTFTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGI  
 RHIGLAAKQ

> Secuencia de aminoácidos de la variante B4 (SEQ ID NO: 21)  
 CSSGGGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTILTLAQQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKIS  
 RFDFFIRQIEVDGQLITLLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTA  
 FGSDDAGGKLTFTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSA  
 EVETANGIRHIGLAAKQ

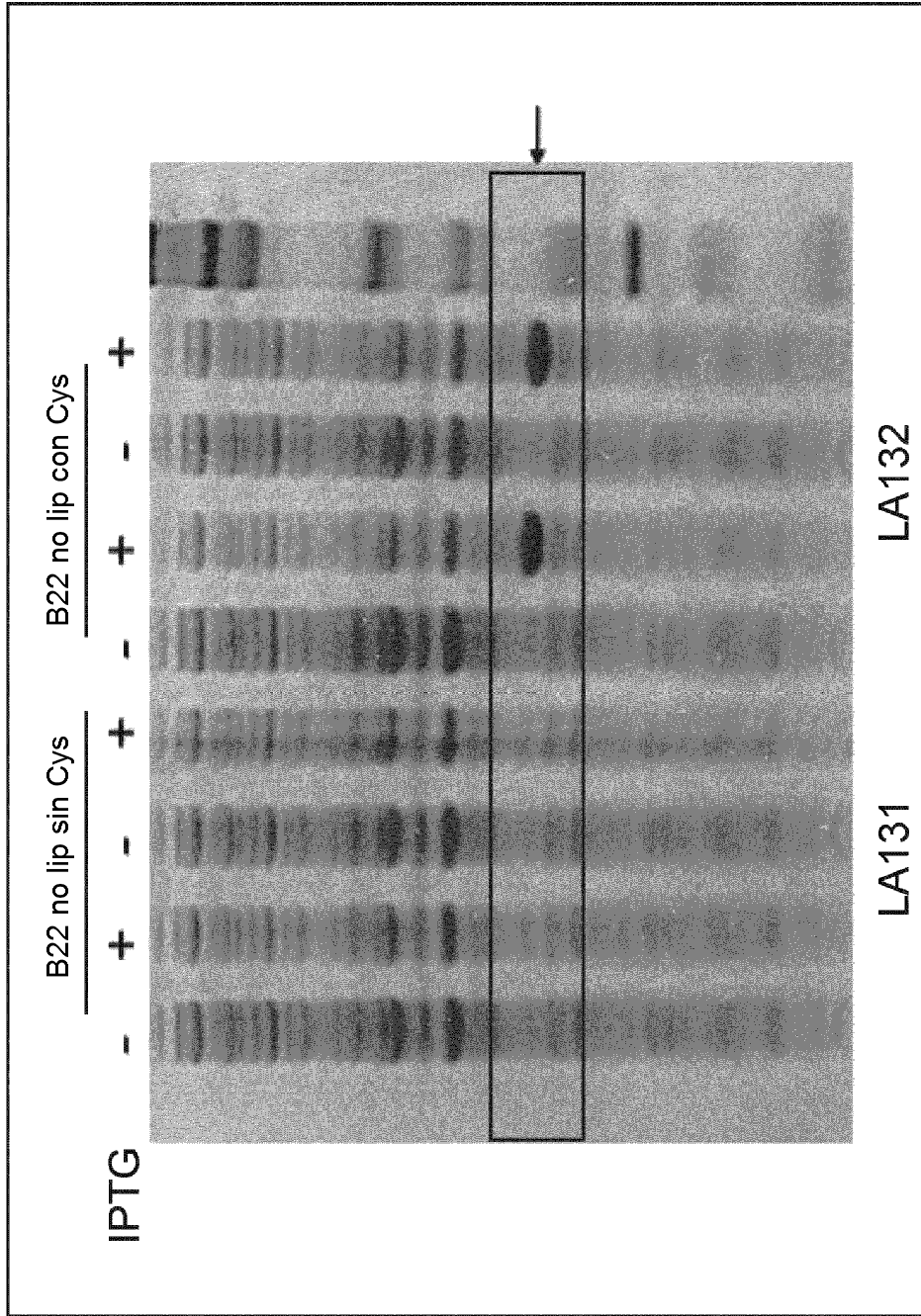


**FIG. 3**



# FIG. 4

La eliminación de la Cys en N-terminal tiene como resultado la pérdida de expresión en *E. coli*



Se obtuvieron resultados similares para la construcción A22 sin Cys

**FIG. 5**

Efecto de la longitud del tallo de Gly/Ser sobre la expresión de la variante de ORF2086 no lipídada

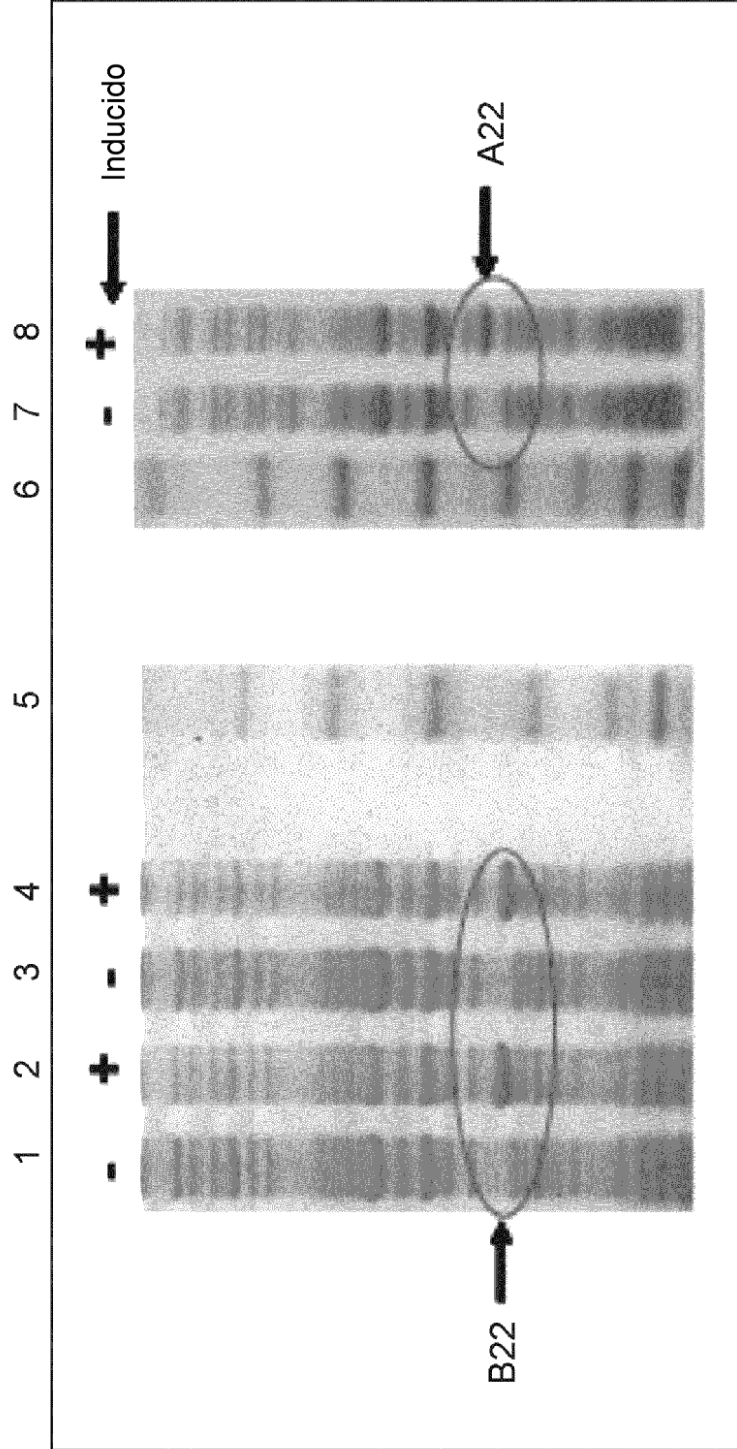
Variante proteica	Expresión de Coomassie sin Cys en N-terminal	¿Gly/Ser adicional?
B01 CSSGGGGGGVTADIGTGLADALTAP	Sí	Sí (+5)
B44 CSSGGGGGGGVAADIGAGLADALTAP	Sí	Sí (+5)
A05 CSSGGGGGGVAAADIGTGLADALTAP	Sí	Sí (+4)
A22 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAP	No*	No
B22 CSSGGGGVAADIGAVLADALTAP	No*	No
A19 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAP	No*	No

\* Sí, si se añade de nuevo Cys en N-terminal



# FIG. 7

La optimización por codón incrementa la expresión de las variantes B22 y A22 no lipidadas



Cambios en el codón de Gly de B09 en N-terminal aplicados a B22 y A22

## FIG. 8A

**> SEQ ID NO: 43**  
 AGCTCTGGAGGTGAGGAAGCGGGGGTGGAGTTGCAGCAGACATTTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCCGT  
 TGGATCATATAAGACAAAGGCTTGAAATCGCTTACCTTAGAAGATTCTATTTACAAAAATGGCACCCCTTACCTTGTCCGGCGCA  
 AGCGCTGAACGTACTTTTAAAGCCGGTGACAAAAGATAATAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAAATCTCGCGT  
 TTTGATTTCAATTCGTCAAATCGAAAGTAGATGGCCAACTTATTACATTAGAAAAGCGGTGAATTTCCAAGTATATAAACAAATCCC  
 ATTCAGCACTTACAGCATTGCAAAACCGAACAGGTTCCAAGACTCAGAACAATTCGGCAAAAATGGTAGCTAAACGTTCAATTTCCG  
 CATCCGTTGACATTTGTCGGTGAACATACAAGCTTCGGAAAATTACCAAAAGATGTGATGGCGACCTATCGCGGTACGGCATTTT  
 GGATCAGATGATGCAGGGCGGTTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAAACAAGGACATGGCAAAAATGAAACATTTAA  
 AATCTCCCGAACTTAACGTAGATCTCGCAGCAGCAGATATAAACCCAGATGAAAAACACCCACGAGTCATTTCAGGTTCAGT  
 TTTATACAATCAGCCAGAAAAGGTTTCGTACTCTTTAGGTATTTTGGCCGGCAAGCTCAAGAAAGTTGCAGGTAGCCGAGAA  
 GTAGAAACGGCAAAATGGCATTCGTCACATTTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

**> SEQ ID NO: 44**  
 SSGGGGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISR  
 FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTA  
 GSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLSIGIFGGQAQEVAGSAE  
 VETANGIRHIGLAAKQ.

## FIG. 8B

> SEQ ID NO: 51  
 AGCAGCGGAGGCGGGAACGGGAGGCGGGGTGTGCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACATAACCGCACCCG  
 TCGACCATAAAGACAAAGGTTGAAATCCCTGACATTTGGAAGACTCCATTTCCAAAACGGAACTACTGACCCCTGTGGCACA  
 AGGTGGGAAAAGAACTTTCAAAGCCGGGACAAAGACAACTCTCAACACAGGCAAACTGAAAGAACGACAAAATCAGCCGC  
 TTTGACTTTATCCGTCAAATCGAAATGGACGGCAGCTCATTTACCTTGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAAACAAAAGCC  
 AATCCGCCCTTAAACCCCTTCAGACCGGAAAGTACAAGACTCGGAGCATTCGGGAAGATGGTTGCGAAAACGCCAGTTTCCAG  
 AATCGGCGACATAGTGGCGAACATACATCTTTGGCAAGCTTCCAAAGACGTCAATGGCGACATATCGCGGACGGCGTTTC  
 GGTTCAGACGATGCCGGGGAAAACCTGACCTACACCATAGATTTGCGCCCAAGCAGGGACACGGCAAAAATCGAAACATTTGA  
 AATCGCCAGAACTCAATGTTGACCTGGCCGCCGATATCAAGCCGGATGAAAACACCCATGCCGTTCATCAGCGGTTCCGT  
 CCTTTACAACCAAGCCGAGAAAGGCAGTTACTCTTAGGCATCTTTGGCGGCAAGCCAGGAAAGTTGCCCGCAGCGCGGAA  
 GTGAAAACCGCAACGGCATACGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

> SEQ ID NO: 45  
 AGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGGGTGGAGTTGCAGCAGACATTTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACCTGACGGCACCCGT  
 TGGATCATAAAAGACAAAGGCTTGCAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAAGGAAAATGAGAACTTAAGTTGGCGGGCA  
 AGCGCTGAAAAAATTTATGGAAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTTC  
 AATCGTCAAATCGAAAGTAGATGGCAAGCTTATACATTAAGAAAGCGGTGAATCCAAGTATATAAACAAATCCCATTCAGCAC  
 TTACAGCATTTGCAAAACCGAACAGGTTCCAGACTCAGAAGATTCGGCAAAAATGGTAGCTAAACGTCAAATTCGCGATCGGTGA  
 CATTCGGGTTGAACATACAAAGCTTCGACAAAATACCAAAAAGCGGCGAGTGCACCTATCGCGGTACGGCATTTGGATCAGAT  
 GATGCAGGCGGTAAAATTAACCTTATACAAATGACTTTGCAGCAAAAACAAAGGACATGGCAAAAATGAACATTTAAAAATCTCCCG  
 AAATTAACGTTAGAGCTCGCAACCGCATATATAAACCCAGATGAAAACCGCCACGCACTCATTTCAGGTTCAAGTTTATACAA  
 TCAGGACGAAAAGGTTTCGTAATTTTAGGTAATTTTGGCGGCAAGCTCAAAGAGTTGCAGGTAGCGCAGAAAGTAGAAACG  
 GCAAATGGCATTCACCACATTTGGGTTAGCGGGCAACAATAA

## FIG. 8C

**>SEQ ID NO: 50**  
 SSGGGSGGGVAAADI GAGLADAL TAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLLKNDKVS RFD  
 FIRQIEVDGKLIITLESGEFQVYKQSHSAL TALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFG  
 SDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVVAGSAE  
 VETANGIHHIGLAAKQ

**> SEQ ID NO: 46**  
 AGCTCTGGAGGTGGAGGAGTTGCAGCAGACATTTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGAC  
 AAAGGCTTGCAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGT CAGGAAAAATGAGAAAACTTAAAGTTGGCGGCGCAAGCGCTGAAAAA  
 ACTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTCAATTCGTCAAATC  
 GAAGTAGATGGCAAGCTTATTACATTAGAAAAGCGGTGAATCCAAAGTATAAACAATCCCATTCAGCACTTACAGCATTG  
 CAAACCGAACAGGTCCAAGACTCAGAAGATTCCGGCAAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCGCATCGGTGACATTCGCGGT  
 GAACATACAAGCTTCGACAAAATTACCAAAAAGGCGGCGAGTCCGACCTATCGCGGTACGGCATTTGGATCAGATGATGCAGGC  
 GGTAAATTAAC TTATA CAAT TGACTTTGCAGCAAAAACAAGGACATGGCAAAAATTAACAATTTAAAATCTCCCGAACTTAAAC  
 GTAGAGCTCGCAACCGCATATATTA AAC CAGATGAAAAACGCCACGCAGTCATTT CAGGTT CAGTTTTATACAATCAGGAC  
 GAAAAAGGTT CGTACTCTTTAGGTATTTTGGCGGCAAGCTCAAGAAAGTTGCAGGTAGCGCAGAAGTAGAAAACGGCAAAAT  
 GGCAATCACCCACATTTGGGTTAGCGGCGGAAACAATAA



## FIG. 8D

>SEQ ID NO: 47

AGCAGCGGGGGGGTGGAGTTGCAGCAGACATTTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACA  
 AAGCTTGCAGTCGGTACCTTAGATCAGTCTGTCCAGGAAAAATGAGAAAACTTAAGTTGGCGGGCAGGCGCTGAAAAAAC  
 TTATGGAAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTTCAATTCGTCAAATCGAA  
 GTAGATGGCAAGCTTATTACATTTAGAAAGCGGTGAATTTCCAAGTATATAAACAAATCCCATTCAGCACTTACAGCATTTGCAAA  
 CCGAACAGGTCCAAGACTCAGAAGATTTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTTCCGCATCGGTGACATTTGCGGGTGAACA  
 TACAAGCTTCGACAAAATTACCAAAAAGCGGCAGTCCGACCTATCCGCGTACGGCATTTGGATCAGATGATGCAGGCGGTAAA  
 TTAACCTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAAACAAGGACATGGCAAAATTTAAACATTTAAAATCTCCCGAACTTAACGTAGAGC  
 TCGCAACCGCATATATTAACACAGATGAAAAACGCCACGCAGTCAATTTAGGTTTCAAGTTTATACAATCAGGACGAAAAAGG  
 TTCGTACTCTTTAGGTATTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAAGTAGAAAACGGCAAAATGGCATTCAC  
 CACATTTGGTTAGCGGGCAAAACAATAA

>SEQ ID NO: 48

AGCAGCGGAGGGGGGGTGTGCCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCCGCACCCTCGACCATAAAGACA  
 AAGGTTTGCAGTCTTTAACACTGGATCAGTCCGTCCAGGAAAAACGAGAAAACCTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAAAAC  
 TTATGGAAAACGGCGACAGCTTAAATACGGGCAAAATTTGAAGAACGACAAGGTGAGCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAA  
 GTGGACGGGAAGCTCATTACCTTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAAACAAGCCATTTCCGCCCTTAACCCGCCCTTCAGA  
 CCGAGCAAAGTACAAAGACTCGGAGGATTTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGGAA  
 TACATCTTTTGACAAAGCTTCCCAAAGCGGCAGTCCGACATATCCGCGGACGGCGTTCCGTTTCAAGCATGCTGGCGGAAA  
 CTGACCTATACTATAGATTTCCCGCCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCCGAACTCAATGTCGAGC  
 TTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACGCCATGCCGTTATCAGCGGTTCCGCTTATACAACCAAGACCAAGAAAG  
 CAGTTACTCCCTCGGTACTTTGGCGGGCAAGCCCAAGGAAGTTGCCCGCAGCGGGAAAGTTGAAACCCGCAAAACGGCATACAC  
 CATATCGGTCCTTGCCGGCCCAAGCAGTAA

## FIG. 8E

>SEQ ID NO: 49  
 SSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAECTYNGDSLNTGKLNKNDKVSRRFDFIRQIE  
 VDGKLIITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGSATYRGTAFGSD  
 DAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAEVAGSAEVEVET  
 ANGIHHIGLAAKQ

>SEQ ID NO: 54  
 AGCAGCGGAAGCGGAAGCGGAGCGGGCGGTGTCCGCCCGGACATCGGCACAGGGCTTGCCGATGCACATAACTGCGCCGCTCG  
 ACCATAAAGACAAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTTGGAAGACTCCATTTCCAAAACGGAACTGACCCCTGTCCGGCACAAGG  
 TCGGGAATAAACTTTCAAAGTCGGGACAAAAGACAAACAGTCTCAATACAGGCAAAATTTGAAAGAACGACAAAATCAGCCGCTTC  
 GACTTTGTGCAAAAAATCGAAAGTGGACGGACAAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAAACAGGACCCACT  
 CCGCCGCTCGTTGCCCTACAGATTTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAAACCAACGCTCCTTCCTTGT  
 CAGCGGTTTGGGCGGAGAACATACCGCCTTCAACCAACTGCCAGCGGCAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCC  
 GACGATGCCCGGGAATACTGACCTATACCATAGATTTTCCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAAATCGAAACACCTGAAAAACAC  
 CCGAGCAGAAATGTCGAGCTTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCCTCATTTTGGCGGACACCGGCTA  
 CGGCAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCTCTTTTCGGCGACCGAGCCCAAGAAAATCGCCGGCTCGGCAACCCTGAAG  
 ATAAGGAAAAAGGTTACGAAAATCGGCATCGCCCGCAACAGTAG

>SEQ ID NO: 55  
 SSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAECTFKVGDKNDSLNTGKLNKNDKISRF  
 DFVQKIEVDGQTTTLASGEFQYKQDHSAAVVALQIEKINNPDKIDSLINQSRFLVSGLGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSS  
 DDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK  
 IREKVHEIGIAGKQ.

## FIG. 8F

> **SEQ ID NO: 57**  
SSGGGGGGVADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSRRFDF  
IRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMWAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSD  
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVE  
ANGIHHIGHLAAKQ

> **GenBank AY330406 (SEQ ID NO: 58)**  
CSSGGGGGGVADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSRRFDF  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMWAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGS  
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVE  
TANGIHHIGHLAAKQ

> **GenBank FJ184191 (SEQ ID NO: 59)**  
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLILDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSRRFDFIRQI  
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFFSSDDAGG  
KLIYITIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGI  
RHIGLAAKQ

> **GenBank AY330385 (SEQ ID NO: 60)**  
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSRRFDFIRQI  
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFFSSDDASG  
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEITANGI  
RHIGLAAKQ

## FIG. 8G

> **SEQ ID NO: 61**  
 GGCAAGCAGCGGAGCGGGGTGTCCGCCCGGCACATCGGCGGGGTGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG  
 ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTGAGGAAAAACGAGAAACTGAAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA  
 AACTTATGGAACCGGCACAGCCTCAATACGGGCAAAATGAAGAACGACAAGGTGAGCCGCTTCGACTTTTATCCGTCAAATC  
 GAAATGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTCCAAAGTGTACAACAACAAGCCATTCGCGCTTAACCCGCCCTTC  
 AGACCGAGCAAGTACAAGATTCCGAGCATTGAGGAAAGATGGTTCCGAAACGCCAGTTCAGAAATCGGCGATATAGCGGGTGA  
 ACATACATCTTTTGAACAAGCTTCCGAAAGCGCAGGGCGACATATCGCGGACGGCATTTCGGTTCAGACGATGCCAGTGGGA  
 AAACGTACCTACACCATAGATTTCCGCCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTTG  
 ACCTGGCCCGCTCCGATATCAAGCCGGATAAAAAACGCCATGCCGTTCAGCGGTTCCGCTTACAAACCAAGCCGAGAA  
 AGGCAGTTACTCTCFAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCAAGTGGAAACCCGCAACCGGCATA  
 CGCCATATCGGTCTTGCCCGCCAAGCAGTAA

> **SEQ ID NO: 62**  
 GSSGGGVAADIGAVLADALTAFLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNLNTGKLNKNDKVSFRDFIRQI  
 EVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTAHQTEQVDSHSGKMKVAKRQFRIGDIAEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASG  
 KLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAASDIKPKRRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGI  
 RHIGLAAKQ

## FIG. 8H

```

> SEQ ID NO: 63
GGCAGCAGCGGAGGCGGGTGTCCGCCGACATCGGCGGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGT CAGGAAAAACGAGAAACTGAAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGAAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAAATGAAAGAACGACAAGGT CAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAA GTGGACGGCAGCTCAATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCAAAATATACAAAACAGGACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAAACCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAAACCAACGCTCCTTCCCTTGT CAGCCGTTTGGGTGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAGCCGAGTATCACGGCAAAAGCAATTCAGCTCCGACGATGCTGGCCGAAAA
CTGACCTATACCATAGATTTCCGCCGCCAAAACAGGGACACGGCAAAAATCGAACACTTGAAAAACACCCGAGCAAAAATGTCGAGC
TTGCCCTCCGCCGAACTCAAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGCGACACCGGCTACGGCGCGGAAAGAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGGCCCAAGAAAATCGCCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGAAAAAGGTT CAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAACAGTAA

> SEQ ID NO: 64
GSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKAAQGAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD FIRQI
EVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGK
LTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP EQNVELASAE LKADEKSHAVI LGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKI REKVH
EIGIAGKQ

```