(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 739 616**

(51) Int. CI.:

A61K 39/095 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2013 PCT/GB2013/052215**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14030003**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2013 E 13765388 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2887956**

(54) Título: **Variante FHBP de Neisseria meningitidis y su uso para vacunación**

(30) Prioridad:

23.08.2012 GB 201215005

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2020

(73) Titular/es:

OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED (100.0%)
Ewert House, Ewert Place, Summertown
Oxford, Oxfordshire OX2 7SG, GB

(72) Inventor/es:

TANG, CHRISTOPH y
LEA, SUSAN

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Variante FHBP de Neisseria meningitidis y su uso para vacunación

La presente invención se refiere a una proteína de unión a factor H con estabilidad mejorada, y en particular al uso de dicha proteína en composiciones inmunogénicas para provocar una respuesta inmunitaria a organismos patógenos. En particular, la invención se refiere a composiciones inmunogénicas para *Neisseria meningitidis.*

La *Neisseria meningitidis* (meningococo) es una bacteria diplocócica encapsulada Gram-negativa que habita en la nasofaringe/vías respiratorias superiores de los seres humanos y es una causa importante de septicemia y meningitis. Las tasas de portador en la población general son normalmente aproximadamente 10 %. Existen aproximadamente 500.000 casos de enfermedad meningocócica, cada una con aproximadamente 50.000 muertes. En países desarrollados, la bacteria es una causa infecciosa frecuente de mortalidad entre niños, tiene importantes impactos sobre la salud pública durante brotes en escuelas y universidades, y puede provocar una profunda incapacidad en los supervivientes. La mortalidad por septicemia meningocócica sigue siendo de aproximadamente 10 %, y los pacientes pueden desarrollar déficits neurológicos y/o pérdida de extremidades.

El organismo *Neisseria meningitidis* es sensible a varios antibióticos de primera línea. Sin embargo, a pesar de esto, un número significativo de pacientes diagnosticados con infección meningocócica fallecen de una aplastante enfermedad o padecen graves complicaciones. Las tasas de mortalidad varían desde 2-3 % en casos de meningitis sin complicar hasta 50 % o más en casos de choque séptico (Cartwright, K. A. y D. A. Ala'Aldeen (1997) J Infect 34:15-19).

La progresión extremadamente rápida de la enfermedad meningocócica y los síntomas tempranos no específicos significan que la vacunación es la mejor forma de proteger las poblaciones de las devastadoras consecuencias de la enfermedad meningocócica.

Las actuales vacunas solo cubren subconjuntos de cepas. Las vacunas basadas en la cápsula de polisacárido (que definen la clasificación en serogrupos) solo son eficaces contra ciertos serogrupos. Este enfoque no se puede usar contra la enfermedad de serogrupo B, que representa más del 95 % de las cepas clínicas en Inglaterra y Gales, y predominantes en países desarrollados. Esto es debido a que la cápsula B es idéntica a una modificación en NCAM-1 humano. Se han usado satisfactoriamente vacunas de vesículas de la membrana externa (OMVs) para prevenir epidemias (la más recientemente en Nueva Zelanda), pero solo confieren protección contra cepas que expresan la misma variante de PorA (una porina de la membrana externa) que en la OMV. Todavía no existe vacuna del serogrupo B que sea adecuada para programas de inmunización rutinaria en Europa y EE.UU.

Otro posible candidato de vacuna es la proteína de unión a factor H (fHbp) encontrada sobre la superficie de *Neisseria meningitidis.*

En individuos sanos, la activación del complemento se controla con precisión mediante las proteínas unidas a la membrana y reguladoras en plasma solubles que incluyen factor H (fH). El factor H es una proteína de 155 kDa compuesta de veinte dominios (denominados repeticiones de la proteína de control del complemento, o CCPs). Varios patógenos se han adaptado para evitar la destrucción mediada por el complemento secuestrando fH hacia su superficie.

fHbp sobre *Neisseria meningitidis* es una lipoproteína de 27 kDa que consiste en dos barriles beta (un barril del extremo N y un barril del extremo C) unidos por un conector de aminoácido corto. Mientras que los hidratos de carbono cargados sobre la superficie del endotelio vascular interaccionan con fH, los aminoácidos cargados en fHbp se unen a fH a afinidades nanomolares en el mismo sitio de este regulador del complemento.

Basándose en las diferencias en el nucleótido y las secuencias de aminoácidos predichas, se han clasificado fHbps de diferentes cepas de *Neisseria meningitidis* usando varios esquemas. Estos incluyen dos subfamilias (A y B) (Murphy E, et al. (2009) The Journal of Infectious Diseases 200: 379-389) o tres grupos de variante (V1, V2 y V3) (Masignani V, et al. (2003) The Journal of Experimental Medicine 197: 789-799), correspondiendo la subfamilia A a V2 y V3, y la subfamilia B a V1 (que es la más abundante). De importancia, las fHbps que pertenecen al mismo grupo de variantes comparten más de 85 % de similitud de aminoácidos, y solo 60-70 % de similitud entre los tres grupos de variantes. fHbp también es un antígeno que provoca respuestas de anticuerpos bactericidas del suero en individuos inmunizados y es un componente clave de las vacunas en investigación para la prevención de enfermedad meningocócica, en particular del serogrupo B, que están siendo actualmente evaluadas en ensayos clínicos. Sin embargo, la inmunización con una proteína que pertenece a una familia de fHbp de variante genera una respuesta específica de variante, sin reactividad cruzada con otros grupos de variantes. Así, una única fHbp no proporcionará protección universal contra enfermedad meningocócica, por lo que es necesaria la inmunización con representantes de cada una de las tres variantes, V1, V2 y V3, para una amplia vacuna.

Masignani V, et al. (2003) The Journal of Experimental Medicine 197: 789-799 desvelan la vacunación contra *Neisseria meningitidis* usando tres variantes de la lipoproteína GNA1870.

Hasta la fecha, ningún estudio de vacunas ha incluido fHbp V2 aún cuando las cepas que expresan esta variante representan aproximadamente 20-30 % de todas las cepas aisladas.

Es, por tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar una novedosa fHbp V2, y en particular una novedosa fHbp V2, que se pueda usar en una composición inmunogénica, en donde la novedosa proteína se puede entonces usar para provocar una respuesta inmunitaria contra *Neisseria meningitidis.* La respuesta inmunitaria provocada contra *Neisseria meningitidis* puede ser protectora.

Según un primer aspecto, la presente invención proporciona una fHbp V2 modificada que tiene elevada estabilidad con respecto a fHbp V2 natural (WT), en donde la fHbp V2 modificada tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID ID: 1 y comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones equivalentes a la posición 30, 31, 37, 38, 41, 102, 107, 109, 132 y 133 en SEQ ID ID: 1.

Una fHbp V2 modificada con elevada estabilidad se puede definir como una proteína en la que el valor máximo del pico izquierdo en un perfil de análisis de DSC (correspondiente al barril beta del extremo N) se incrementa al menos aproximadamente 5 ºC en comparación con una proteína fHbp natural.

El perfil de DSC para una fHbp V2 WT muestra el desplegamiento independiente de los dos barriles, el barril del extremo N y el barril del extremo C. En una fHbp WT, el pico que representa el desplegamiento del barril del extremo C muestra fusión a temperaturas superiores a 80 ºC. A diferencia, en fHbp V2 WT, el barril del extremo N presenta un punto de fusión muy reducido, entre 30 ºC y 40 ºC, que indica que este barril se despliega fácilmente. Este desplegamiento del barril del extremo N en fHbp V2 WT puede explicar el aumento de susceptibilidad de la proteína a la escisión proteolítica, ya que los sitios de reconocimiento de proteasa en una proteína inestable son accesibles a la enzima. En una fHbp V2 modificada, el máximo punto de fusión del barril del extremo N se puede aumentar hasta entre aproximadamente 40 ºC y aproximadamente 60 ºC.

La presente solicitud desvela una fHbp V2 modificada que tiene elevada inmunogenicidad con respecto a una fHbp V2 natural (WT).

La secuencia de seis fHbp V2 WT se da en la Figura 3.

La referencia en el presente documento a una fHbp V2 modificada se refiere a una proteína con una secuencia de aminoácidos que no se encuentra normalmente en la naturaleza y en su lugar se produce y/o modifica artificialmente.

En una realización, la fHbp V2 modificada tiene una o más sustituciones de aminoácidos en el barril beta del extremo N. Los aminoácidos que están mutados pueden estar situados internamente en el barril beta cuando la proteína está plegada. Se pueden mutar no más de cuatro aminoácidos consecutivos.

La fHbp V2 modificada puede tener una mutación en una o ambas de Ser^{132} y Gly^{133}. La fHbp V2 modificada puede tener una mutación en ambas de Ser^{132} y Gly^{133}. La fHbp V2 modificada puede tener una mutación en Ser^{132}.

La fHbp V2 modificada puede tener una mutación en Ser30, Asp102, Ser132 y Gly133. La fHbp V2 modificada puede tener una mutación en Ser30, Leu109, Ser132 y Gly133. La fHbp V2 modificada puede tener una mutación en Ser30, Asp102, Leu109, Ser132 y Gly133. La fHbp V2 modificada puede tener una mutación en Ser30, Asp102, Val107, Leu109, Ser132 y Gly133. La fHbp V2 modificada puede tener una mutación en ambas de Val107 y Leu109.

La fHbp V2 modificada puede tener una o ambas de las siguientes mutaciones, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$. La fHbp V2 modificada puede tener ambas de las siguientes mutaciones, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$. La fHbp V2 modificada puede tener las siguientes mutaciones, $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$. La fHbp V2 modificada puede tener las siguientes mutaciones, $Ser^{30}Gly$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$. La fHbp V2 modificada puede tener las siguientes mutaciones, $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$. La fHbp V2 modificada puede tener las siguientes mutaciones, $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Val^{107}Thr$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$. La fHbp V2 modificada puede tener las siguientes mutaciones, $Val^{107}Thr$ y $Leu^{109}Phe$. La fHbp V2 modificada puede tener la siguiente mutación, $Ser^{132}Gly$.

Alternativamente, o además, se pueden hacer una o más sustituciones, inserciones o deleción de aminoácidos en la región de conector que conecta los barriles del extremo N y C. Se pueden hacer una o más sustituciones, inserciones o deleción de aminoácidos en los aminoácidos 141 a 153 en una proteína de SEQ ID ID: 1 o una proteína con al menos 95 % o más identidad con SEQ ID ID: 1.

La referencia en el presente documento a una fHbp puede referirse a la proteína de unión a factor H de *Neisseria meningitidis.*

La fHbp V2 modificada puede no ser una proteína quimérica. La fHbp V2 modificada puede no tener barriles beta de

diferentes variantes de fHbp.

En la presente invención, se puede usar al menos una fHbp V2 modificada como antígeno. La fHbp se puede modificar adicionalmente para prevenir, o reducir, la unión de fH a fHbp. La unión de fH a fHbp tras la administración de la fHbp en una formulación de vacuna a un sujeto puede alterar el éxito de la vacuna. Primero, la presencia de fH sobre la fHbp puede limitar el reconocimiento de epítopes críticos sobre la proteína de unión a factor H por el sistema inmunitario del hospedador. Los anticuerpos generados contra estos epítopes pueden ser tanto bactericidas como inhibir la unión de fH a bacterias que los vuelven sensibles a la lisis mediada por el complemento. Segundo, las respuestas inmunitarias contra la fHbp también pueden provocar respuestas contra fH unido, de un modo similar a un hepteno. Esto puede conducir a una posible respuesta autoinmunitaria no deseada. Finalmente, la activación del complemento participa en respuestas inmunitarias ya que las proteínas del complemento tienen actividad de adyuvante. La reducción de la activación del complemento en el sitio de inmunización por reclutamiento de fH podría alterar el nivel de inmunidad obtenida tras la vacunación.

Según otro aspecto, la invención proporciona una fHbp V2 modificada en donde tanto Ser^{132} como Gly^{133} están mutadas, las mutaciones pueden comprender $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$.

Según otro aspecto, la invención proporciona una fHbp V2 modificada en donde Ser30, Asp102, Ser132 y Gly133 están mutadas, o en donde Ser35, Leu109, Ser132 y Gly133 están mutadas, o en donde Ser30, Asp102, Leu109, Ser132 y Gly133 están mutadas, o en donde Ser30, Asp102, Val107, Leu109, Ser132 y Gly133 están mutadas, o en donde Val107 y Leu109 están mutadas, o en donde Ser30 está mutada.

Las mutaciones pueden comprender $Ser^{132}Gly$ y/o $Gly^{133}Asp$; o $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o $Ser^{30}Gly$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Val^{107}Thr$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o $Val^{107}Thr$ y $Leu^{109}Phe$; o $Ser^{132}Gly$.

Las mutaciones pueden estar en el barril beta del extremo N de la proteína plegada.

Una fHbp V2 que comprende ambas de las mutaciones $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$ puede ser más estable que una variante V2 que no las tiene.

La fHbp modificada puede tener al menos 95 % o más identidad de secuencia con una secuencia de la Figura 3, tal como la secuencia de SEQ ID ID: 1, pero se modifica en al menos un posición que aumenta la estabilidad de la proteína. La modificación puede ser un aminoácido diferente.

El porcentaje de identidad de secuencia se define como el porcentaje de aminoácidos en una secuencia que son idénticos a los aminoácidos en una secuencia proporcionada después de alinear las secuencias e introducir huecos si fuera necesario para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede lograr de muchas formas que se conocen bien por el experto en la técnica, e incluyen, por ejemplo, usar BLAST (herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos del Centro Nacional para Información Biotecnológica).

Las variaciones en el porcentaje de identidad pueden ser debidas, por ejemplo, a sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser naturaleza de conservativa, y así el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, por ejemplo la sustitución de leucina con isoleucina es una sustitución conservativa.

Según un aspecto adicional, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una fHbp V2 modificada según cualquier aspecto de la invención.

Una composición inmunogénica es una composición que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria a la fHbp V2 modificada cuando la composición se administra a un sujeto. El sujeto puede ser un animal humano o no humano. El sujeto puede ser un mamífero.

La respuesta inmunitaria provocada por la composición de la invención puede afectar la capacidad de *N. meningitidis* para infectar un ser humano inmunizado. La capacidad de *N. meningitidis* para infectar un ser humano inmunizado con la composición de la invención puede ser impedida o prevenida. Esto se puede lograr de varias formas. La respuesta inmunitaria provocada puede reconocer y destruir *N. meningitidis.* Alternativamente, o además, la respuesta inmunitaria provocada puede impedir o prevenir la replicación de *N. meningitidis.* Alternativamente, o además, la respuesta inmunitaria provocada puede impedir o prevenir que la *N. meningitidis* cause enfermedad en un animal humano o no humano. La composición puede provocar una respuesta bactericida de anticuerpos eficaces contra cepas bacterianas que expresan fHbp V2. La respuesta inmunitaria provocada por la composición de la invención puede ser equivalente o superior a una respuesta inmunitaria provocada por fHbp V2 natural.

La fHbp modificada se puede producir recombinantemente (por ejemplo, a partir de un sistema de expansión genéticamente manipulado) o ser un producto sintético, por ejemplo producido por síntesis de péptidos *in vitro* o

traducción *in vitro*.

La composición de la invención también puede comprender uno o más antígenos adicionales, además de la fHbp V2 modificada. Los antígenos adicionales también se pueden obtener de *N. meningitidis* y pueden ser capaces de provocar una respuesta inmunitaria dirigida hacia *N. meningitidis.*

La composición se puede usar para provocar/producir una respuesta inmunitaria protectora cuando se administra a un sujeto. La respuesta inmunitaria protectora puede provocar que *N. meningitidis* sea destruida tras la infección del sujeto, o puede prevenir o inhibir que *N. meningitidis* se replique y/o cause enfermedad.

La composición se puede usar como una vacuna profiláctica o terapéutica dirigida hacia *N. meningitidis.* Según un aspecto adicional, la invención proporciona una vacuna profiláctica o terapéutica dirigida hacia *N. meningitidis* que comprende una fHbp V2 modificada según la invención.

Según un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una fHbp V2 modificada según la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede ser capaz de producir una respuesta inmunitaria protectora a *N. meningitidis.*

La expresión "producir una respuesta inmunitaria protectora", como se usa en el presente documento, significa que la composición es capaz de generar una respuesta protectora en un organismo hospedador, tal como un mamífero humano o no humano, al que se administra. Una respuesta inmunitaria protectora puede proteger contra la posterior infección por *N. meningitidis.* La respuesta inmunitaria protectora puede eliminar o reducir el nivel de infección reduciendo la replicación de *N. meningitidis* o afectando el modo de acción de *N. meningitidis* para reducir la enfermedad.

Los expertos en la técnica conocerán bien los excipientes y vehículos aceptables adecuados. Estos pueden incluir vehículos sólidos o líquidos. Los vehículos líquidos adecuados incluyen agua y solución salina. Las proteínas de la composición se pueden formular en una emulsión o se pueden formular en microesferas o liposomas biodegradables.

La composición puede comprender además un adyuvante. Los expertos en la técnica conocerán bien los adyuvantes adecuados, y pueden incluir adyuvante incompleto de Freund (para su uso en animales), y sales metálicas, tales como sales de aluminio o calcio.

La composición también puede comprender polímeros u otros agentes para controlar la consistencia de la composición, y/o para controlar la liberación del antígeno/proteína secretada de la composición.

La composición también puede comprender otros agentes tales como diluyentes, que pueden incluir agua, solución salina, glicerol u otros alcoholes adecuados, etc.; agentes humectantes o emulsionantes; agentes de tamponamiento; espesantes, por ejemplo, celulosa o derivados de celulosa; conservantes; detergentes, agentes antimicrobianos; y similares.

Los principios activos en la composición pueden ser superiores a 50 % de pureza, normalmente superiores a 80 % de pureza, frecuentemente superiores a 90 % de pureza. Los principios activos pueden ser superiores a 95 %, 98 % o 99 % de pureza. Usándose casi siempre principios activos que se aproximan a 100 % de pureza, por ejemplo aproximadamente 99,5 % de pureza o aproximadamente 99,9 % de pureza.

Según un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende una o más fHbp modificadas según la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad meningocócica.

La composición de la presente invención se puede usar como vacuna contra infecciones provocadas por *N. meningitidis.* La composición se puede usar como vacuna dirigida a meningitis u otras enfermedades meningocócicas invasivas que incluyen septicemia o choque séptico. La vacuna se puede administrar profilácticamente a aquellos en riesgo de exposición a *N. meningitidis,* y/o terapéuticamente a personas que ya se han expuesto a *N. meningitidis.*

Si la composición se usa como una vacuna, la composición puede comprender una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno en donde la composición comprende al menos una fHbp V2 modificada. Una "cantidad inmunológicamente eficaz" de un antígeno es una cantidad que cuando se administra a un individuo, ya sea en una dosis única o en una serie de dosis, es eficaz para el tratamiento o la prevención de infección por *N. meningitidis.* Esta cantidad variará dependiendo de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar y del antígeno. La determinación de una cantidad eficaz de una composición inmunogénica o de vacuna para administración a un organismo está perfectamente dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

Una composición según la invención puede ser para administración oral, sistémica, parenteral, tópica, mucosa,

intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intranasal, intravaginal, intrarrectal, transdérmica, sublingual, inhalación o aerosol.

La composición se puede disponer para ser administrada como una dosis única o como parte de un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples se pueden administrar como una inmunización primaria, seguida por una o más inmunizaciones de refuerzo. Se pueden determinar rutinariamente los momentos adecuados entre las inmunizaciones de sensibilización y de refuerzo.

Una composición según la invención se puede usar aisladamente, o se puede combinar con una o varias de otras composiciones inmunogénicas o de vacuna, y/o con una o varias de otras pautas terapéuticas.

Las composiciones de la invención pueden ser capaces de inducir respuestas de anticuerpos bactericidas en suero y provocar que los anticuerpos medien en la opsonfagocitosis después de administrarlas a un sujeto. Estas respuestas pueden estar convenientemente mediadas en ratones y los resultados son un indicador estándar de la eficacia de vacunas.

Las composiciones de la invención pueden, por tanto, o alternativamente, ser capaces de provocar una respuesta inmunitaria que neutraliza las proteínas bacterianas u otras moléculas, previniendo así que tengan su función normal y previniendo o reduciendo la progresión de la enfermedad sin destruir necesariamente el organismo patógeno/bacteria, en este caso a *N. meningitidis.*

Una composición según la invención también puede comprender uno o más antígenos adicionales, además de la fHbp V2 modificada. Los antígenos adicionales también se pueden obtener de *N. meningitidis* y pueden ser capaces de provocar una respuesta inmunitaria dirigida a *N. meningitidis.* Los antígenos adicionales pueden incluir uno o más de una fHbp V1 y una fHbp V3.

La presente solicitud desvela el uso de una o más fHbp V2 modificadas en la preparación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria. El medicamento se puede usar para la vacunación profiláctica o terapéutica de sujetos contra *N. meningitidis.* El medicamento puede ser una vacuna profiláctica o terapéutica. La vacuna puede ser para meningitis, septicemia y/o choque séptico provocado por *N. meningitidis.*

La solicitud desvela una composición que comprende una o más fHbp V2 modificadas para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria a *N. meningitidis.* La respuesta inmunitaria puede ser profiláctica o terapéutica. La composición puede ser para su uso como una vacuna.

La presente solicitud desvela un método de protección de un animal humano o no humano de los efectos de la infección por *N. meningitidis* que comprende administrar al animal humano o no humano una composición según cualquier aspecto de la invención o una fHbp V2 que ocurre modificada según cualquier aspecto de la invención. La composición puede ser una vacuna.

La presente solicitud desvela un método de producción de una respuesta inmunitaria en un animal humano o no humano que comprende administrar una composición farmacéutica según la invención al animal humano o no humano. La respuesta inmunitaria puede ser protectora. El método puede producir una respuesta de refuerzo en un paciente que ya ha sido sensibilizado. La respuesta inmunitaria puede ser profiláctica o terapéutica.

Una forma de comprobar la eficacia de un tratamiento terapéutico que comprende la administración de una composición según la invención implica monitorizar la infección de *N. meningitidis* después de la administración de la composición. Una forma de comprobar la eficacia de un tratamiento profiláctico que comprende la administración de una composición según la invención implica monitorizar las respuestas inmunitarias a *Neisseria meningitidis* después de la administración de la composición.

La presente solicitud desvela el uso de una o más fHbp V2 modificadas en la preparación de un medicamento para su uso en la inmunización de mamíferos humanos o no humanos contra infección por *N. meningitidis.*

La presente solicitud desvela un kit para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un organismo, que comprende una composición inmunogénica o de vacuna según la invención e instrucciones referentes a la administración.

Además de su posible uso como vacunas, las composiciones según la invención pueden ser útiles como reactivos de diagnóstico y como una medida de la competencia inmunitaria de una vacuna.

Según otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una fHbp V2 modificada según la invención.

Según aún en un aspecto adicional, la invención proporciona una célula hospedadora que contiene el ácido nucleico anterior.

El experto apreciará que cualquiera de las características opcionales tratadas anteriormente se puede aplicar a cualquiera de los aspectos o realizaciones de la invención.

Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora, simplemente a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

Figura 1A - DSC de una proteína V2 natural (trazo verde/oscuro) y la fHbp modificada V2MUT (trazo rojo/claro, con las modificaciones $Ser^{137}Gly$ y $Gly^{138}Asp$) que contiene dos cambios de aminoácido en el barril del extremo N. Los dos picos para cada proteína representan el desplegamiento del barril del extremo N (pico izquierdo, a temperaturas más bajas) y barril del extremo C (pico derecho). La modificación de la proteína V2 aumenta el pico asociado al barril del extremo C y desplaza el pico hacia temperaturas más altas.

Figura 1B - DSC de fHbp V1 (línea roja), V2 (línea azul) y V3 (línea verde) que muestran el desplegamiento del barril del extremo C a aproximadamente 80 ºC para todas las variantes, y el barril del extremo N a temperaturas más bajas.

Figura 2 - Sensibilidad de la proteína V2 natural (V2WT) y estabilizada (V2MUT) a la escisión proteolítica. Se incubaron las proteínas en presencia de la proteasa para concentraciones crecientes de tripsina (derecha a izquierda) y se analizaron por SDS:PAGE.

Figura 3 - Muestra secuencias de algunas fHbp V2 WT, aminoácidos idénticos se muestran con asteriscos. FHbp_V2_péptido_22 se denomina en el presente documento SEQ ID ID: 1. FHbp_V2_péptido_23 se denomina en el presente documento SEQ ID ID: 2. FHbp_V2_péptido_25 se denomina en el presente documento SEQ ID ID: 3. FHbp_V2_péptido_21 se denomina en el presente documento SEQ ID ID: 4. FHbp_V2_péptido_16 se denomina en el presente documento SEQ ID ID: 5. FHbp_V2_péptido_19 se denomina en el presente documento SEQ ID ID: 6. En toda la secuencia, el barril beta del extremo N engloba los aminoácidos números 20 a 141, y los restos de aminoácidos 141 a 153 representan un enlace entre los barriles beta del extremo N y C.

Figura 4 - Muestra una representación en boceto de la estructura de fHbp V1 con los seis cambios de aminoácidos estabilizantes de fHbp V2 mapeados en ella. La figura se creó usando PyMol basado en pdb entrada 2W80.

Figura 5 - Ilustra el efecto de estabilizar mutaciones en fHbp V2. Se midió la capacidad calorífica (Cp) de mutantes de fHbp V2 por DSC. **Figura 5A** - fHbp V2 con sustituciones individuales y dobles de aminoácidos. **Figura 5B** - Cuatro combinaciones de mutaciones que mostraron el mayor aumento en la estabilidad. **Figura 5C** - M6 en comparación con fHbp V1, V2 y V3 WT.

Figura 6 - Muestra la susceptibilidad de fHbps V2 estabilizadas a la digestión con proteasa. Se tiñó SDS:PAGE con azul de Coomassie de fHbp V2 tras el tratamiento de la proteasa en diluciones sucesivas (carriles 3-10).

Figura 7 - Muestra títulos de SBA de ratones. Los animales recibieron diferentes dosis de fHbp V2 natural y M6 (mostradas) en tres ocasiones, y se determinó SBA para mezcla de sueros contra una cepa clínica que expresa fHbp V2. Barras de error: DE de ensayos realizados por triplicado.

Los datos presentados en el presente documento demuestran la inestabilidad inherente de la fHbp V2 WT, en particular la inestabilidad del barril beta del extremo N. Esta inestabilidad demuestra su falta de idoneidad para el desarrollo de vacuna, tanto para producto antigénico fiable como debido a que se conoce que varios anticuerpos bactericidas requieren epítopes conformacionales que implican tanto los barriles beta del extremo N como C.

Aún más, los datos también demuestran que mutando la secuencia de aminoácidos del barril beta del extremo N se puede aumentar significativamente la estabilidad de la fHbp V2. Entonces se puede usar la proteína estabilizada como inmunógeno.

fHbp V2 modificada estable

Se mutó fHbp V2 WT con la secuencia de la Figura 3, SEQ ID ID: 1, usando PCR para cambiar el aminoácido en la posición 137 de serina a glicina y el aminoácido en la posición 138 de glicina a ácido aspártico. Ambas de estas mutaciones están en el barril beta del extremo N de la proteína. La proteína modificada producida se denomina en el presente documento V2MUT.

Se evaluó la estabilidad del mutante producido por calorimetría diferencial de barrido (DSC, Figura 1) y por susceptibilidad a la escisión por proteasa (Figura 2).

La Figura 1 demuestra claramente que la proteína V2MUT ha aumentado espectacularmente la estabilidad en comparación con la proteína natural. El barril del extremo N tiene una temperatura de fusión media de

aproximadamente 50 ºC, en comparación con aproximadamente 35 ºC para la proteína natural. No se observó cambio significativo en la estabilidad en el barril del extremo C de la proteína V2MUT.

La estabilidad mejorada de fHbp V2 mutante se soporta además por los resultados del estudio de escisión proteolítica (Figura 2). Se genera más producto de escisión (banda inferior) cuando la proteína natural se incuba con proteasa que cuando la proteína V2MUT se trata en condiciones idénticas. Esto demuestra que V2MUT es menos susceptible a la digestión, debido a la elevada estabilidad de la proteína.

Eficacia de V2MUT como inmunógeno

Se inmunizan ratones hembra BALB/c de seis a ocho semanas de edad (Charles Rivers) con antígenos (20 µg de fHbp V2 WT o fHbp V2MUT) con hidróxido de aluminio adsorbido girando la mezcla durante una hora a temperatura ambiente. Se administran inmunógenos por vía intraperitoneal (ratones transgénicos) en los días 0, 21 y 35; los sueros se recogen en el día 49. En los estudios de inmunización con ratones transgénicos C57B1/6, los antígenos se administran por vía intraperitoneal a ratones de doce a dieciséis semanas de edad en los días 0, 21 y 35, y se recoge sangre completa por anestesia terminal y punción cardíaca de los ratones en el día 49. Todos los procedimientos se realizan según las directrices del Ministerio del Interior.

Se recubren pocillos de placas de ELISA (Nunc) con fHbp V2 mutante (V2MUT) (100 ng) durante la noche a 4 ºC, se lavan, se bloquean durante una hora con 3 % de suero de cabra normal diluido en PBS-T, luego se añaden sueros en un intervalo de diluciones. La unión se detecta usando IgG de cabra conjugada con HRP antiratón (Dako, 1 en 1.000) y se incuban durante una hora a temperatura ambiente. Se añade el sustrato (ONPG, Sigma) a pocillos, la reacción se detiene con HCl 3 N, y la lectura a A492 con un fotómetro Multiskan (Thermo Scientific).

Para ensayos bactericidas de suero, se resuspende MC58 de *N. meningitidis* en tampón de ensayo SBA (0,1 % de glucosa en PBS) hasta una concentración final de 5 x 10^4 UFC/ml y se mezcla con un volumen igual de complemento humano. También se preparan pocillos de control que contienen bacterias sin suero o sin complemento. Se reúnen sueros de los grupos de ratones no transgénicos (n >8), y las inmunizaciones se repiten en dos o tres ocasiones para cada antígeno; para ratones transgénicos, se prueban los sueros de animales individuales. Tras la incubación, se siembran 10 µl de cada pocillo sobre medio sólido, y se determina el número de bacterias supervivientes después del crecimiento durante la noche. La actividad bactericida se expresa como el recíproco de la mayor dilución de sueros requerida para destruir más de 50 % de bacterias.

Los ratones inmunizados como se ha descrito anteriormente con la fHbp V2 WT y mutante (V2MUT) demostrarán que la fHbp V2 que ocurre modificada estabilizada (V2MUT) es significativamente más inmunogénica que la fHbp WT.

Estudios adicionales

No se incluye fHbp V2 en ninguna de las dos vacunas que actualmente están sometiéndose a ensayos clínicos. Esto podría ser debido a que su inestabilidad inherente previene que sea un buen candidato a vacuna (Johnson et al, 2012). Se podría mejorar la cobertura de la vacuna incluyendo fHbps V2 como 20-30 % de cepas aisladas de *N. meningitidis* que expresan fHbps V2. Para hacer esto, fHbp V2 necesitaría ser estabilizada.

Previamente, los presentes inventores encontraron que una región de fHbp V2 participa en su susceptibilidad a digestión por tripsina. Esta región se usó como el sitio para un cribado a gran escala para identificar mutaciones que aumentan la estabilidad de fHbp V2. Se mutaron los aminoácidos en esta región a su resto equivalente en seis fHbp V1. Se identificaron las mutaciones (S35G, D107S, V112T, L114F, S137G, G138D) que potencian la estabilidad de fHbp V2 (Fig. 4). Estas seis mutaciones están todas en el barril del extremo N de fHbp.

Para identificar la combinación más eficaz de cambios para estabilizar fHbp V2, se expresaron 13 fHbps V2 (Tabla 1) con diferentes combinaciones de estos seis cambios de aminoácido.

Nombre de mutante	Cambios de aminoácido
M4A	S35G/D107S/S137G/G138D
M4B	S35G/L114F/S137G/G138D
M5	S35G/D107S/L114F/S137G/G138D
M6	S35G/D107S/V112T/L114F/S137G/G138D
V112T	V112T
D107S	D107S
L114F	L114F
S35G	S35G
S137G/G138D	S137G/G138D
V112T/L114F	V112T/L114F
D107S/L114F	D107S/L114F
S35G/D107S	S35G/D107S

Nombre de mutante	Cambios de aminoácido
S35G/D107S/L114F	S35G/D107S/L114F

Tabla 1: fHbps V2 estabilizada. Se analizó la estabilidad de estos mutantes de fHbp V2. La tabla contiene el nombre del mutante y los cambios de aminoácido hechos en fHbp V2 WT.

Se evaluó la estabilidad de fHbps V2 por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar las temperaturas de fusión de los dos barriles □. El barril □ del extremo N de fHbp WT funde primero (T_m1) a 37,30 ºC, mientras que el barril □ del extremo C funde (T_m2) a 83,06 ºC. Esto indica que el barril del extremo N es menos estable que el barril del extremo C. Se determinaron los perfiles de DSC para los treces mutantes. Se muestran en la Fig. 5A los perfiles de DSC de cuatro mutantes, que contienen las seis mutaciones en combinaciones individuales o dobles. El aumento del valor de T_m1 con respecto a fHbp V2 WT indica un aumento en la estabilidad del barril del extremo N. No hubo cambio en los valores de T_m2 entre WT y los mutantes, que muestra que no existe cambio en la estabilidad del barril del extremo C. Los perfiles de DSC de los trece mutantes (no mostrados) mostraron que los cuatro mutantes que tenían el mayor aumento en la estabilidad fueron: M4A, M4B, M5 y M6 (Fig. 5B). Sus valores T_m1 (Tabla 2) tuvieron el mayor aumento, que indica mayor estabilidad de su barril del extremo N. A partir de DSC, M6 fue más estable que cualquiera de M4A, M4B o M5 con una T_m1 de 55,96 ºC para M6 en comparación con 54,03, 54,79, 55,46 ºC para M4A, M4B y M5, respectivamente. El valor de T_m1 de M6 es inferior a los valores de T_m1 de fHbp V1 y V3 WT (Fig. 5C), que indica que su barril del extremo N es menos estable.

mutante	Tm1 (ºC)	□H1 (kJ)	Tm2 (ºC)	□H2 (kJ)
WT	37,30	24,6	83,06	101,7
L114F	36,06	32,7	83,06	114,6
D107S/L114F	39,35	44,3	82,95	96,8
V112T	39,95	22,7	83,00	107,6
D107S	40,23	48,4	83,14	109,5
S35G	42,14	49,2	83,20	111,2
S35G/D107S/L114F	42,50	50,5	82,90	101,8
V112T/L114F	43,81	44,6	83,08	101,2
S35G/D107S	47,26	66,2	83,05	115,7
S137G/G138D	49,56	58,1	82,54	111,5
M4A	54,03	70,6	82,56	104,6
M4B	54,79	70,4	82,57	105,0
M5	55,46	76,2	82,40	100,9
M6	55,96	79,6	82,56	108,7

Tabla 2: Temperatura de fusión de los barriles □ del extremo N y C (T_m1 y T_m2, respectivamente) y la entalpía de fusión de los barriles □ del extremo N y C (□H1 y □H2, respectivamente) de mutantes de fHbp V2 estabilizados en comparación con fHbp V2 WT.

Selección de fHbp V2 más estable

Para definir adicionalmente la estabilidad de los cuatro mutantes de fHbp V2 más estables, se realizaron ensayos de digestión con proteasa. Se usaron cinco proteasas diferentes: tripsina, proteinasa K, colagenasa, dispasa y papaína. Los cuatro mutantes mostraron resistencia potenciada a la digestión de proteasa en comparación con fHbp V2 WT. M6 fue el menos susceptible a la digestión de proteasa con colagenasa, proteinasa K, dispasa y papaína (Fig. 6). Los cuatro mutantes (M4A, M4B, M5 y M6) mostraron resistencia potenciada a la digestión con tripsina en comparación con fHbp V2 WT, pero no hubo una clara diferencia entre ellos con esta proteasa. Para proteinasa K, dispasa y papaína, M6 mostró la mayor resistencia a la digestión de proteasa, seguido por M5, coherente con los mutantes de fHbp V2 que contienen más mutaciones que son más estables. M4A y M4B muestran niveles intermedios de susceptibilidad. En resumen, tanto la digestión por DSC como por proteasa indican que el mutante fHbp V2 con seis cambios de aminoácidos estabilizantes (M6) es el más estable.

Unión de fH a fHbps V2 estables

Para determinar el efecto de estabilizar fHbp V2 en la unión a fH, se llevó a cabo SPR usando los cuatro mutantes de fHbp V2 más estables inmovilizados sobre el chip sensor y circulando fH_{67} sobre ellos. Se calcularon los valores de K_d para la unión de fH_{67} a las fHbps V2 estables a partir del sensograma (unión de fH_{67} a fHbp V2 WT mostrada en el Apéndice 3a) y en comparación con la unión de fH_{67} a fHbp V2 WT (Tabla 3). Los valores de K_d para M4A, M4B y M5 fueron entre dos y cuatro veces más altos (que indica una menor afinidad de unión) que para fHbp V2 WT, mientras que K_d para M6 es casi veinte veces mayor. La disminución en la unión de fH_{67} de M6 es posiblemente beneficiosa, ya que esto ayudará a producir un candidato a vacuna de fHbp V2 estable que no se une a fH.

Proteína	K_d promedio (nM)	K_d relativa
WT	3,18 ± 0,11	1,00
M4A	7,60 ± 0,17	2,39
M4B	12,50 ± 0,21	3,92
M5	12,20 ± 0,71	3,84
M6	61,30 ± 6,86	19,29

Tabla 3: Unión de fH a fHbps V2: Tabla de valores de K_d y valores relativos de K_d para fHbps V2 en comparación con fHbp V2 WT. Media ± desviación estándar de dos determinaciones.

Inmunogenicidad de M6 en comparación con fHbp V2 WT

Se comparó la inmunogenicidad de M6 con fHbp V2 WT. Se inmunizaron ratones no transgénicos con tres cantidades diferentes de tanto fHbp V2 WT como M6 para establecer una respuesta a dosis. Para evaluar la respuesta inmunitaria, se determinó la actividad bactericida en suero (SBA) de sueros de ratones inmunizados. El SBA es un correlato de protección contra enfermedad meningocócica. Los resultados muestran que fHbp V2 M6 tiene inmunogenicidad equivalente o mejor que la proteína natural debido a que SBA se detecta todavía en ratones vacunados con la dosis más baja de fHbp V2 M6, mientras que los ratones que recibieron la misma cantidad de la proteína natural dejaron de provocar SBA (Fig. 7).

Materiales y métodos

Crecimiento bacteriano y análisis de Western

Se cultivó *N. meningitidis* en 5 % de CO_2 en placas de agar con infusión cerebro-corazón (BHI) con suplemento de Levanthal, y se propagó *Escherichia coli* en medio líquido de LB con agitación a 200 r.p.m. o sobre placas de agar de LB (1,5 % de agar p/vol). Se prepararon lisados de células completas de *N. meningitidis* cultivadas durante la noche sobre medios sólidos, luego se resuspendió en PBS. Se determinó la concentración de bacterias midiendo la densidad óptica a 260 nm de lisados bacterianos en 1 % de SDS/NaOH 0,1 M [15] y se ajustó hasta 1 x 10^9 UFC/ml, y se resuspendió con un volumen igual de 2x tampón de carga de SDS-PAGE (Tris-HCl 100 mM a pH 6,8, β-mercaptoetanol 20 µM, 4 % de SDS, 0,2 % de azul de bromofenol, 20 % de glicerol), y se hirvió durante 10 minutos; se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en un Mini Trans-Blot Cell los geles de poliacrilamida que se tiñeron o bien con azul de Coomassie o proteínas. Se incubaron las membranas con anticuerpos primarios, luego secundarios diluidos en PBS-T y 1 % de leche desnatada (PBS-TM), que se detectaron usando el método de detección por transferencia Western de Amersham ECL (GE Healthcare). Para detectar la unión de fH, se incubaron transferencias en o bien suero humano normal (NHS 1:100), purificado (5 µg/ml) o fH recombinante diluido en PBS-TM durante dos horas, se lavaron, luego se incubaron pAb de cabra anti-fH (Quidel, 1 en 2.000); luego se incubaron membranas con IgG murina conjugada con HRP anticabra (Sigma, 1 en 10.000).

Modificación de fHbp y fH

Se introdujeron mutaciones puntuales en fHbp por mutagénesis por PCR dirigida al sitio con enzima Roche Expand High Fidelity o usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Agilent Technologies) siguiendo los protocolos del fabricante, y los cebadores

Stijn-2. P22-S137G/G138D-fwd:
CGCTCCTTCCTTGTCGGCGATTTGGGTGGAGAACAT

Stijn-2.P22-S137G/G138D-rev:
ATGTTCTCCACCCAAATCGCCGACAAGGAAGGAGCG

Se expresaron en células B834 (DE3) de *E. coli* proteínas marcadas con His y se aislaron usando perlas magnéticas de agarosa Ni-NTA (Qiagen) siguiendo los protocolos del fabricante y se dializaron contra acetato sódico 50 mM, pH 4,5.

Análisis de DSC

Se llevaron a cabo experimentos de DSC usando un DSC VP Capillary (GE Healthcare) usando una velocidad de calentamiento de 1 ºC/min desde 30 hasta 110 ºC. Se repitió la muestra de V2 desde 10 hasta 110 ºC cuando su evento de fusión más bajo se identificó a aproximadamente 35 ºC para garantizar que esta transición estuvo flanqueada por nivel inicial suficiente para permitir el análisis. Las muestras contuvieron 20 uM de cada variante en Tris 25 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM. Se desgasificaron muestras y tampón agitando a vacío antes de la realización. Se hizo el análisis de datos con el software suministrado con el instrumento por los fabricantes (Origin versión 7.0) restando la referencia de tampón de los datos de muestras y corrección de nivel inicial.

Escisión proteolítica

Se investigó la sensibilidad de fHbp V2 WT y mutante (V2MUT) a la escisión proteolítica por digestión con tripsina. Se incubaron cinco □g de proteína fHbp V2 con tripsina que variaron desde 50 ng hasta 0,2 ng durante 1 h a 37 ºC y la escisión se visualizó por SDS:PAGE.

Referencia

Design and evaluation of meningococcal vaccines through structure-based modification of host and pathogen molecules. Johnson S, Tan L, van der Veen S, Caesar J, Goicoechea De Jorge E, Harding RJ, Bai X, Exley RM, Ward PN, Ruivo N, Trivedi K, Cumber E, Jones R, Newham L, Staunton D, Ufret-Vincenty R, Borrow R, Pickering MC, Lea SM, Tang CM. PLoS Pathog. 2012;8(10):e1002981.

REIVINDICACIONES

1. Una fHbp V2 modificada que tiene elevada estabilidad con respecto a fHbp V2 natural, en donde la fHbp V2 modificada tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID ID: 1 y comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones equivalentes a la posición 30, 31, 37, 38, 41, 102, 107, 109, 132 y 133 en SEQ ID ID: 1.

2. La fHbp V2 modificada de la reivindicación 1, en donde el máximo valor del pico izquierdo en un perfil de análisis de DSC de la proteína se incrementa al menos aproximadamente 5 ºC en comparación con una fHbp natural; y/o que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en el barril beta del extremo N.

3. La fHbp V2 modificada de la reivindicación 1 o 2 que comprende una mutación en una o ambas de Ser^{132} y Gly^{133}, y opcionalmente que comprende ambas de las mutaciones $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
que comprende una mutación en Ser30, Asp102, Ser132 y Gly133; y opcionalmente en donde las mutaciones comprenden $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
que comprende una mutación en Ser30, Leu109, Ser132 y Gly133; y opcionalmente en donde las mutaciones comprenden $Ser^{30}Gly$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
que comprende una mutación en Ser30, Asp102, Leu109, Ser132 y Gly133; y opcionalmente en donde las mutaciones comprenden $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
que comprende una mutación en Ser30, Asp102, Val107, Leu109, Ser132 y Gly133; y opcionalmente en donde las mutaciones comprenden $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Val^{107}Thr$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
que comprende una mutación en Val107 y Leu109; y opcionalmente en donde las mutaciones comprenden $Val^{107}Thr$ y $Leu^{109}Phe$.

4. Una fHbp V2 modificada según la reivindicación 1, en donde tanto Ser^{132} como Gly^{133} están mutadas.

5. La fHbp V2 modificada de la reivindicación 4, en donde las mutaciones son $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
en donde Ser30, Asp102, Ser132 y Gly133 están mutadas; y opcionalmente en donde las mutaciones son $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
en donde Ser30, Leu109, Ser132 y Gly133 están mutadas; y opcionalmente en donde las mutaciones son $Ser^{30}Gly$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
en donde Ser30, Asp102, Leu109, Ser132 y Gly133 están mutadas; y opcionalmente en donde las mutaciones son $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$; o
en donde Ser30, Asp102, Val107, Leu109, Ser132 y Gly133 están mutadas; y opcionalmente en donde las mutaciones son $Ser^{30}Gly$, $Asp^{102}Ser$, $Val^{107}Thr$, $Leu^{109}Phe$, $Ser^{132}Gly$ y $Gly^{133}Asp$.

6. Una fHbp V2 modificada según la reivindicación 1, en donde tanto Val107 como Leu109 están mutadas; y opcionalmente en donde las mutaciones son $Val^{107}Thr$ y $Leu^{109}Phe$.

7. Una composición inmunogénica que comprende una fHbp V2 modificada según cualquier reivindicación precedente.

8. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, en donde la composición es capaz de provocar una respuesta bactericida de anticuerpos a *N. meningitidis*; y/o comprende uno o más antígenos adicionales, además de la fHbp V2 modificada.

9. Una vacuna profiláctica o terapéutica dirigida a *N. meningitidis* que comprende una fHbp V2 modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10. Una composición farmacéutica que comprende una fHbp V2 modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10 que es capaz de producir una respuesta inmunitaria protectora a *N. meningitidis.*

12. Una composición que comprende una o más fHbp V2 modificadas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad meningocócica.

13. Un ácido nucleico que codifica una fHbp V2 modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

14. Una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 13.

Figura 1A

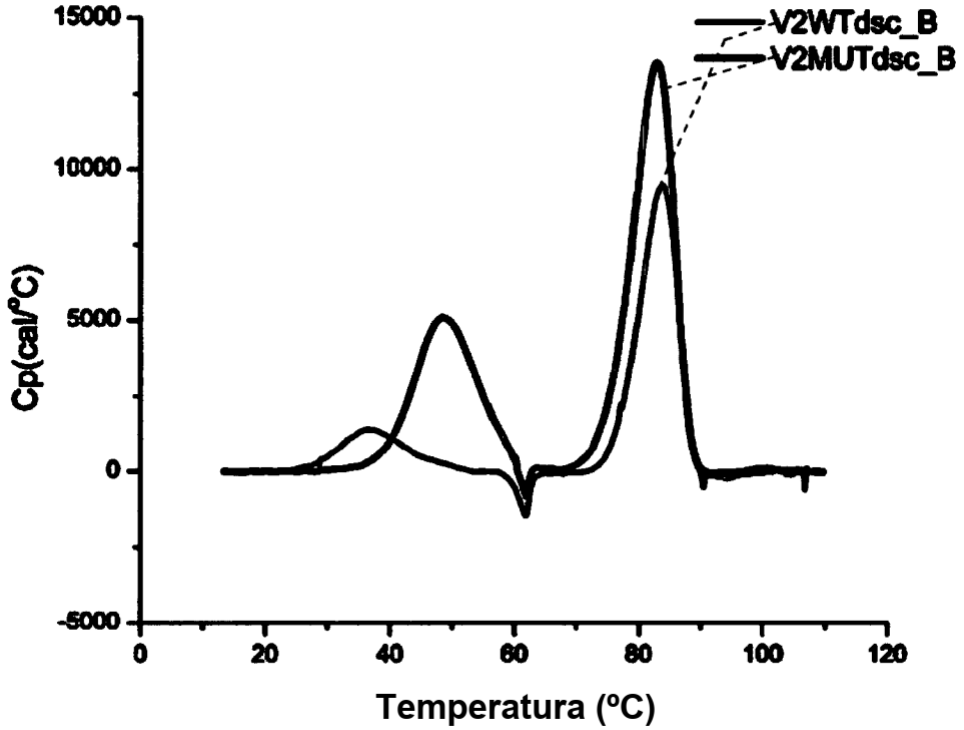
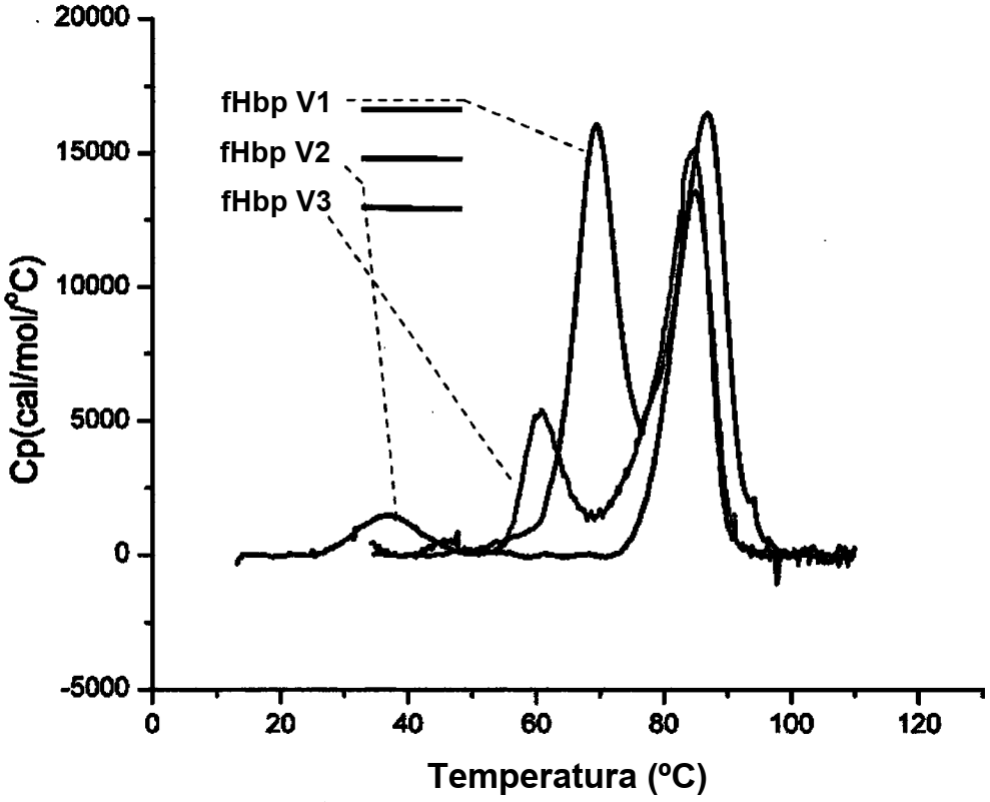


Figura 1B



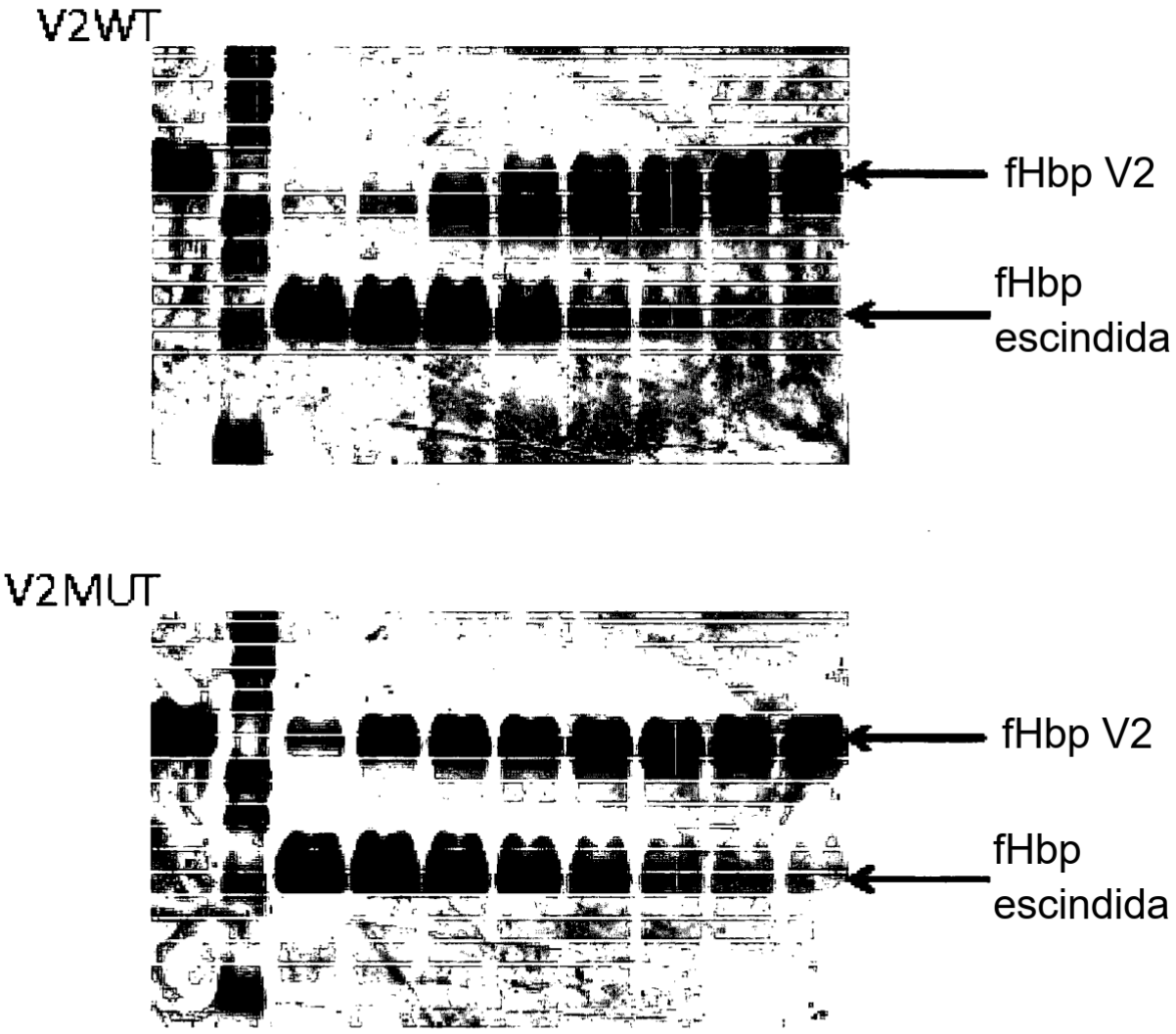


Figura 2

```
FHbp_V2 2.P22     5 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNG 65
FHbp_V2 2.P23     5 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNG 65
FHbp_V2 2.P25     5 CSSGGGGVAADIGAGLADALTTPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNG 65
FHbp_V2 2.P21     5 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNG 65
FHbp_V2 2.P16     5 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNG 65
FHbp_V2 2.P19     5 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNG 65
                    **********************:*******.******************************

FHbp_V2 2.P22    66 DSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKI 125
FHbp_V2 2.P23    66 DSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKI 125
FHbp_V2 2.P25    66 DSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKI 125
FHbp_V2 2.P21    66 DSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKI 125
FHbp_V2 2.P16    66 DSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKI 125
FHbp_V2 2.P19    66 DSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKI 125
                    *************************** *** *********:******************

FHbp_V2 2.P22   126 DSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRI 185
FHbp_V2 2.P23   126 DSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRI 185
FHbp_V2 2.P25   126 DSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRI 185
FHbp_V2 2.P21   126 DSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRI 185
FHbp_V2 2.P16   126 DSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKI 185
FHbp_V2 2.P19   126 DSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKI 185
                    *************************.**************..*:* *:***: ***:*:*

FHbp_V2 2.P22   186 EHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK 245
FHbp_V2 2.P23   186 EHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK 245
FHbp_V2 2.P25   186 EHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK 245
FHbp_V2 2.P21   186 EHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK 245
FHbp_V2 2.P16   186 EHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK 245
FHbp_V2 2.P19   186 EHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK 245
                    *************:*********************.*************************

FHbp_V2 2.P22   246 IREKVHEIGIAGKQ 259
FHbp_V2 2.P23   246 IREKVHEIGIAGKQ 259
FHbp_V2 2.P25   246 IREKVHEIGIAGKQ 259
FHbp_V2 2.P21   246 IREKVHEIGIAGKQ 259
FHbp_V2 2.P16   246 IGEKVHEIGIAGKQ 259
FHbp_V2 2.P19   246 IREKVHEIGIAGKQ 259
                    * ************
```

Figura 3

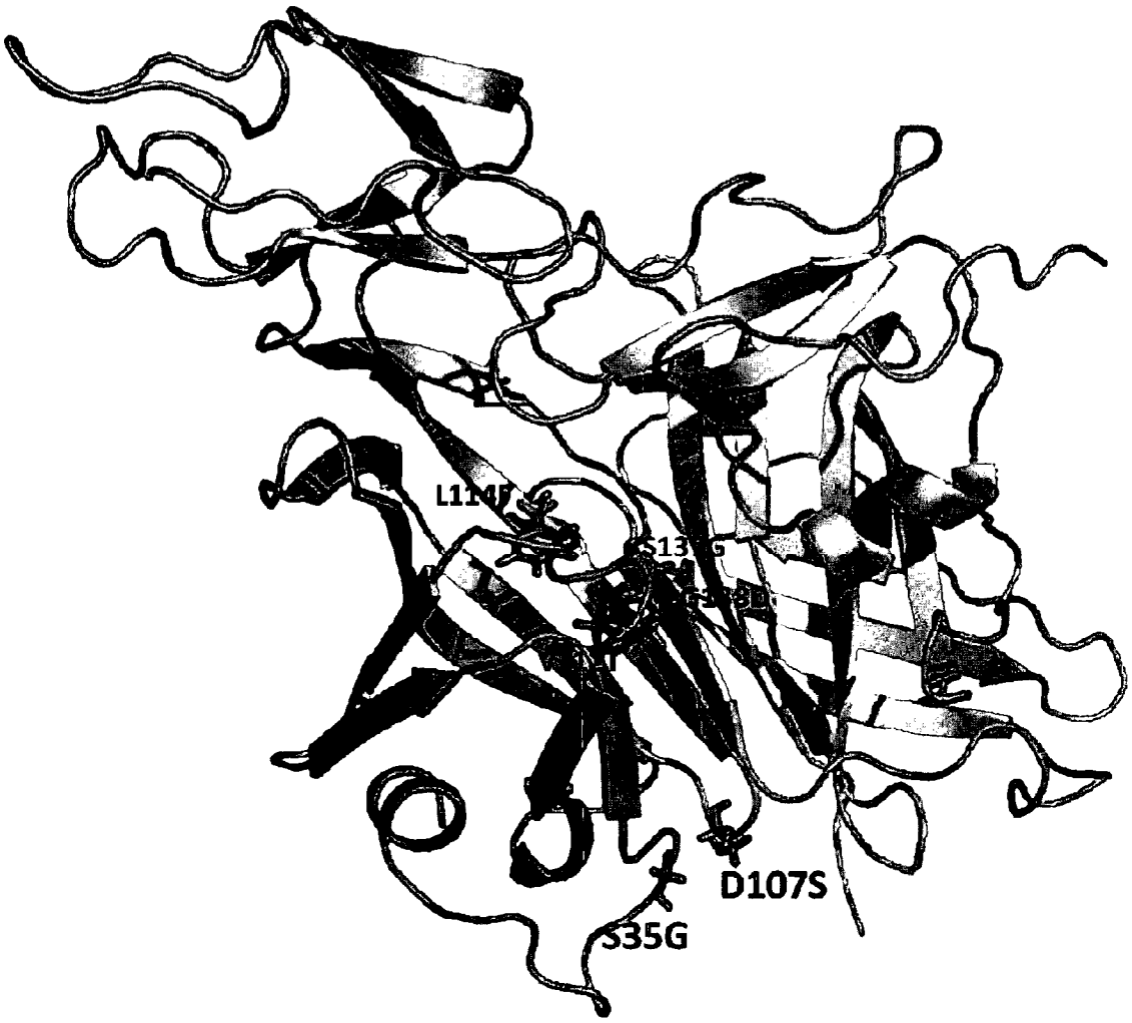


Figura 4

Figura 5A

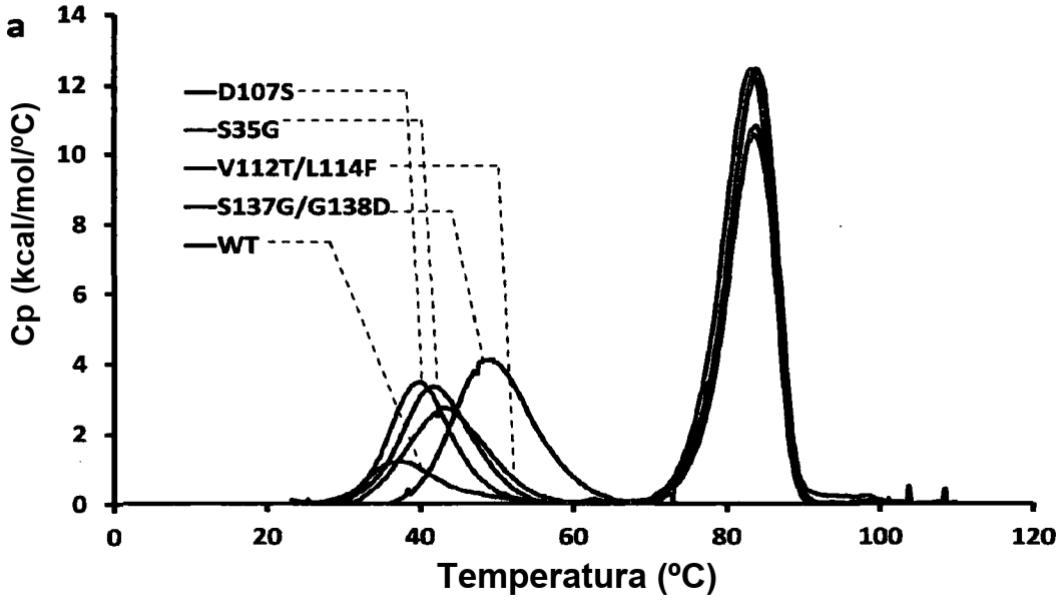


Figura 5B

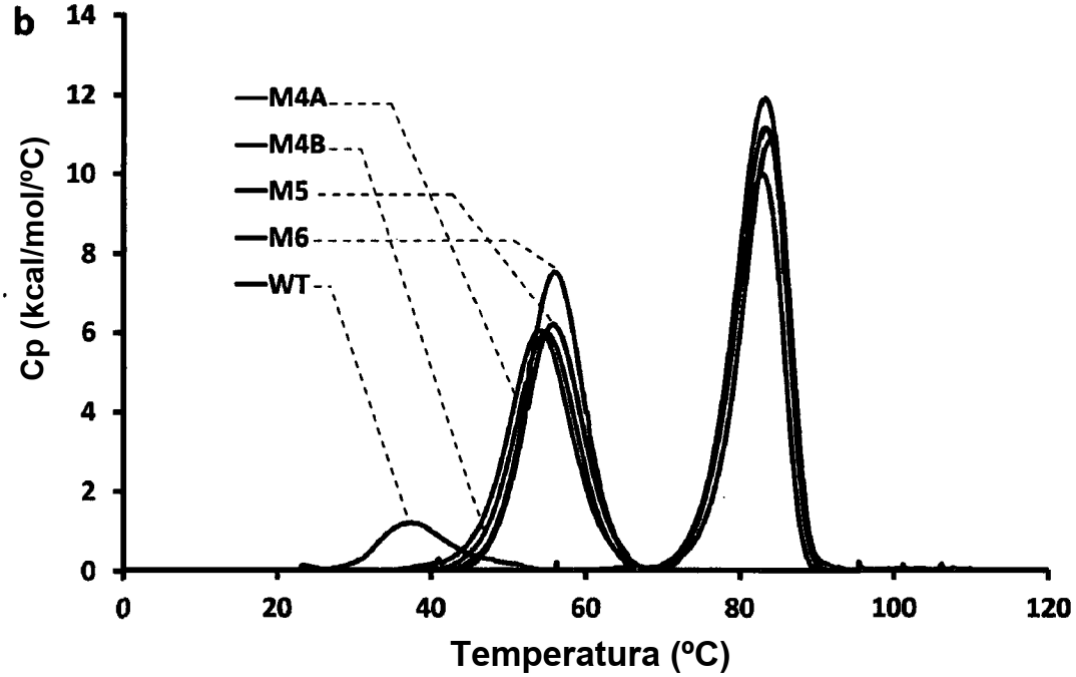


Figura 5C

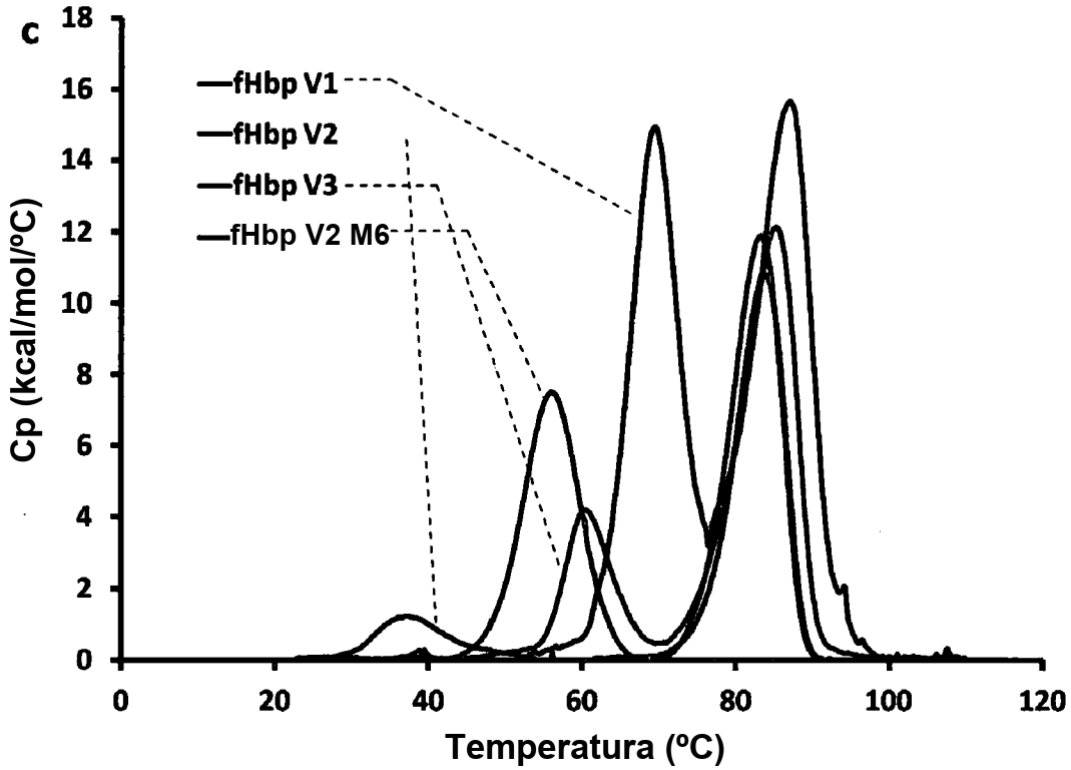

c
fHbp V1
fHbp V2
fHbp V3
fHbp V2 M6
Cp (kcal/mol/ºC)
Temperatura (ºC)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
20
40
60
80
100
120

Figura 6

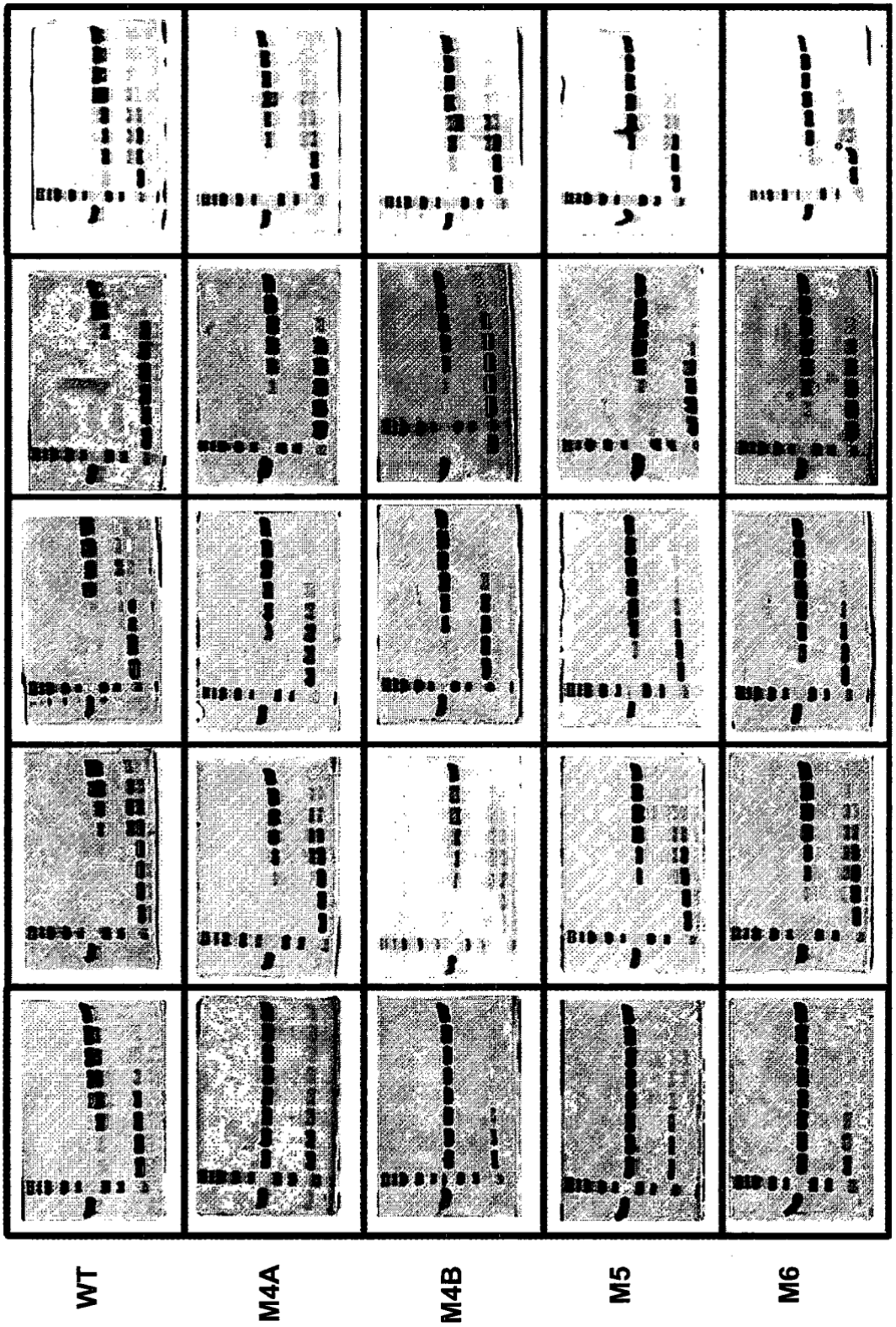
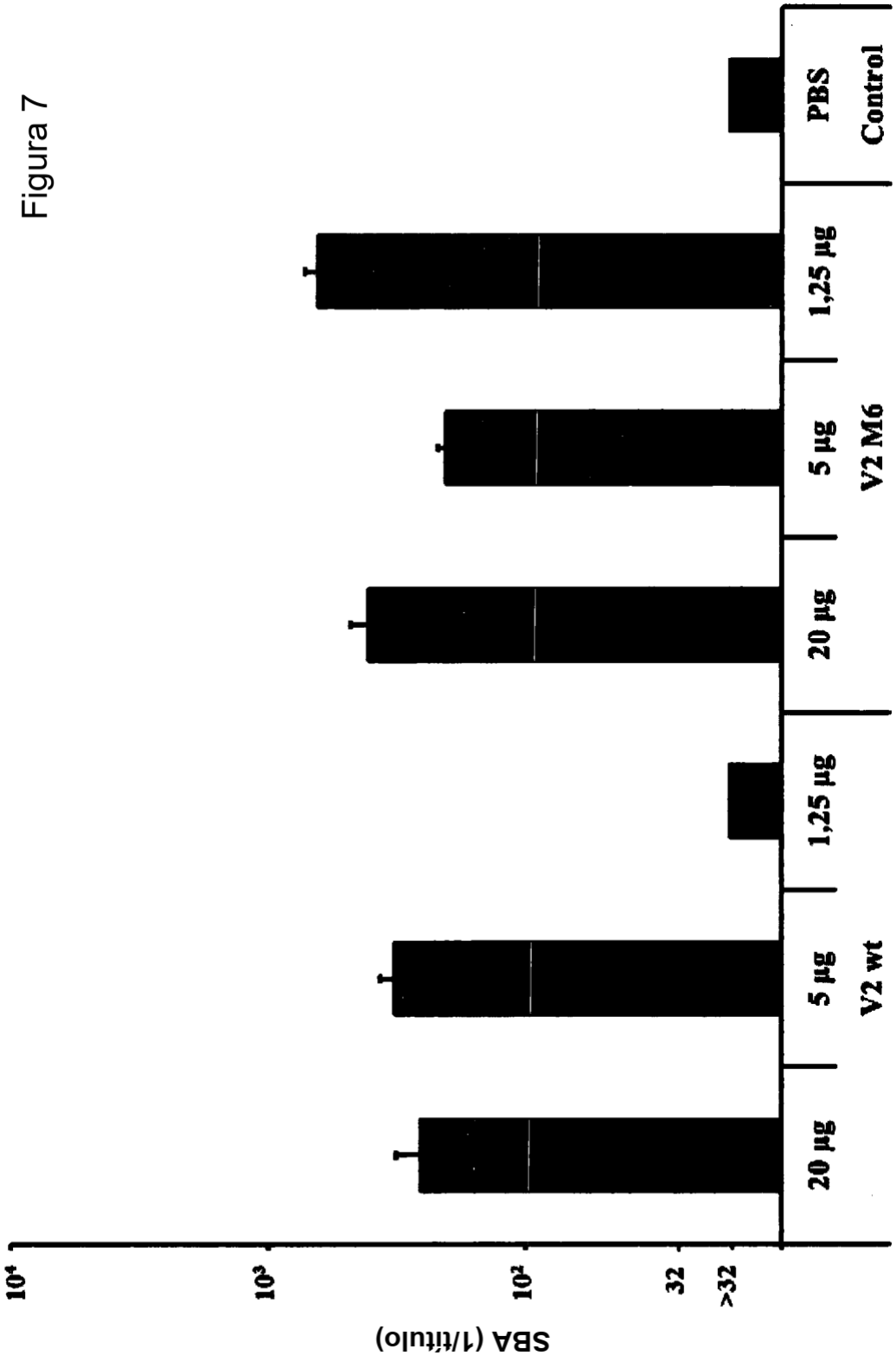

Tripsina
Proteinasa K
Colagenasa
Dispasa
Papaína
WT
M4A
M4B
M5
M6

Figura 7


SBA (1/título)
10⁴
10³
10²
32
>32
20 µg
5 µg
1,25 µg
V2 wt
20 µg
5 µg
1,25 µg
V2 M6
PBS
Control