

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 484**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2011 PCT/IB2011/053957**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12032498**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011 E 11764868 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2613805**

54 Título: **Meningococo que sobreexpresa NadA y/o NHBA y vesículas de la membrana externa derivadas del mismo**

30 Prioridad:

04.01.2011 US 201161429673 P
10.09.2010 US 381859 P

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

11.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SERRUTO, DAVIDE;
PIZZA, MARIAGRAZIA y
DELANY, ISABEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 759 484 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

Meningococo que sobreexpresa NadA y/o NHBA y vesículas de la membrana externa derivadas del mismo

Campo técnico

La presente invención está en el campo de las vacunas meningocócicas basadas en vesículas de membrana.

5 Técnica antecedente

- Actualmente se están investigando varias vacunas contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* ("MenB"). Algunos de estos se basan en vesículas de membrana externa (VME), tal como el producto Novartis MENZB™, el producto del Finlay Institute VA-MENGOC-BC™ y el producto MENBVAC™ del Instituto Noruego de Salud Pública. La referencia 1 desvela la construcción de vesículas a partir de cepas modificadas para expresar seis subtipos diferentes de PorA. Las referencias 2-4 informan sobre estudios preclínicos de una vacuna de VME en la que la fHbp (también conocida como GN1870) se sobreexpresa (y esta sobreexpresión se puede combinar con la eliminación de LpxL1 [5]). La referencia 6 informó recientemente de un estudio clínico de cinco formulaciones de una vacuna de VME en la que PorA y FrpB están eliminados y Hsf y TbpA se sobreexpresan. La referencia 7 informa de una vacuna de vesículas de membrana externa nativa preparada a partir de bacterias que tienen los genes *synX*, *LpxL1* e *IgtA* inactivados. El documento WO2006/046143 (Referencia 31) describe una bacteria que tiene una mutación inactiva de su gen *mltA* e informa que la inactivación del homólogo meningocócico *mltA* proporciona bacterias que liberan espontáneamente vesículas que son ricas en proteínas inmunogénicas de la membrana externa y que pueden provocar respuestas de anticuerpos de protección cruzada con títulos bactericidas más altos que las VME preparadas mediante procesos de producción normales.
- Es un objeto de la invención proporcionar VME meningocócicas adicionales y mejoradas, y también proporcionar meningococos adicionales y mejorados para su uso en la producción de vacunas.

Divulgación de la invención

- Un primer aspecto de la invención proporciona un meningococo que expresa NadA y opcionalmente NHBA, en el que el meningococo es isogénico con una cepa parental, excepto por una modificación genética que hace que el meningococo exprese más NadA y opcionalmente más NHBA que la cepa parental, en el que el meningococo no expresa NadR y en el que la bacteria no expresa un MltA activo.
- Un segundo aspecto de la invención proporciona un procedimiento para preparar una cepa meningocócica adecuada para la preparación de VME, que comprende las etapas de (i) elegir una cepa de partida que exprese NadA y opcionalmente NHBA; y (ii) modificar la cepa de partida para aumentar la cantidad de NadA y opcionalmente NHBA que expresa, en el que el meningococo no expresa NadR y no expresa un MltA activo.
- Un tercer aspecto de la invención proporciona vesículas de membrana externa meningocócicas preparadas a partir del meningococo del primer aspecto de la invención o preparadas por el procedimiento del segundo aspecto de la invención.
- Un cuarto aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica inmunogénica que comprende vesículas de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

Sobreexpresión

- La invención proporciona vesículas de membrana externa meningocócica en las que ciertos antígenos se sobreexpresan. Al menos NadA se sobreexpresa, y NHBA opcionalmente también se sobreexpresa.
- Tal como se analiza más adelante, estas vesículas se obtienen de bacterias que sobreexpresan los antígenos relevantes. La bacteria ya puede expresar el o los antígenos, pero incluye una modificación genética que, en comparación con una bacteria sin esa modificación, aumenta la expresión del antígeno. Esta modificación generalmente se introducirá utilizando técnicas recombinantes, tales como mutagénesis dirigida al sitio o recombinación homóloga dirigida, de modo que las vesículas de la invención se obtienen generalmente de bacterias recombinantes. Típicamente, una bacteria incluirá (i) un gen bajo el control de un promotor con el que no se encuentra en la naturaleza y/o (ii) una inactivación de un gen que se encuentra en la bacteria en la naturaleza.
- Como resultado de la sobreexpresión, las vesículas de la membrana externa preparadas a partir del meningococo modificado contienen niveles más altos de los antígenos sobreexpresados. El aumento de la expresión en las VME es útil al menos del 10 %, medido en masa del antígeno relevante por unidad de masa de VME, y es más útil al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 100 % o más.
- Las modificaciones recombinantes adecuadas que pueden usarse para causar la sobreexpresión de un antígeno incluyen, pero sin limitación: (i) reemplazo del promotor; (ii) adición de genes; (iii) reemplazo de genes; o (iv) inactivación del represor.

En el reemplazo del promotor, El promotor que controla la expresión del gen del antígeno en una bacteria se reemplaza por un promotor que proporciona niveles más altos de expresión. Por ejemplo, el gen podría colocarse bajo el control de un promotor de un gen metabólico de mantenimiento. En otras realizaciones, el gen del antígeno se coloca bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. De manera similar, el gen puede modificarse para garantizar que su expresión no esté sujeta a variación de fase. Los procedimientos para reducir o eliminar la variabilidad de fase de la expresión génica en meningococos se desvelan en la referencia 8. Estos procedimientos incluyen el reemplazo del promotor, o la eliminación o reemplazo de un motivo de ADN que es responsable de la variabilidad de fase de un gen.

Además de genes, una bacteria que ya expresa el antígeno recibe una segunda copia del gen relevante. Esta segunda copia puede integrarse en el cromosoma bacteriano o puede estar en un elemento episomal como un plásmido. La segunda copia puede tener un promotor más fuerte que la copia existente. El gen puede colocarse bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. El efecto de la adición del gen es aumentar la cantidad de antígeno expresado. Cuando se usa un plásmido, idealmente es un plásmido con un alto número de copias, por ejemplo, por encima de 10, o incluso por encima de 100.

En el reemplazo de genes, se produce la adición del gen, pero se acompaña de la delección de la copia existente del gen. Por ejemplo, este enfoque se utilizó en la referencia 4, en la que el gen *fHbp* cromosómico endógeno de una bacteria se delecionó y reemplazó por una copia codificada por un plásmido (véase también la referencia 9). La expresión de la copia de reemplazo es mayor que la de la copia anterior, lo que conduce a sobreexpresión.

En la inactivación del represor, se inactiva una proteína que reprime la expresión de un antígeno de interés. Por lo tanto, la represión no se produce y el antígeno de interés puede expresarse a un nivel superior.

Los promotores de genes sobreexpresados pueden incluir ventajosamente un CREN [10].

La cepa modificada que se sobreexpresa es isogénica con su cepa original, excepto por una modificación genética. Como resultado de la modificación, la expresión del antígeno de interés en la cepa modificada es mayor (en las mismas condiciones) que en la cepa original. Una modificación típica será colocar un gen bajo el control de un promotor con el que no se encuentra en la naturaleza y/o eliminar un gen que codifica un represor.

En realizaciones en las que se sobreexpresa NHBA, se pueden utilizar varios enfoques. Por conveniencia, puede usarse el enfoque ya informado en la referencia 11, es decir, la introducción de un gen NHBA bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Mediante este enfoque, el nivel de expresión de NHBA puede ser proporcional a la concentración de IPTG añadida a un cultivo. El promotor puede incluir un CREN.

Para sobreexpresar NadA, el meningococo no expresa NadR. Un enfoque útil implica la eliminación del gen que codifica NadR (NMB1843), que es una proteína represora transcripcional [12] que regula por disminución o reprime el gen que codifica NadA en todas las cepas analizadas. La eliminación de NadR da como resultado una expresión constitutiva de alto nivel de NadA. Un enfoque alternativo para lograr la sobreexpresión de NadA es agregar 4-hidroxifenilacético al medio de cultivo. Un enfoque adicional es introducir un gen NadA bajo el control de un promotor inducible por IPTG.

En algunas realizaciones, una bacteria sobreexpresa tanto NHBA como NadA.

Además de sobreexpresar NadA, y opcionalmente NHBA, una bacteria puede sobreexpresar uno o más antígenos adicionales. Por ejemplo, una bacteria puede sobreexpresar uno o más de: (a) NhhA; (b) TbpA; (c) HmbR; (d) TbpB; (e) NspA; (f) Cu, Zn-superóxido dismutasa; (g) Omp85; (h) App; y/o (i) fHbp. La sobreexpresión de NhhA ya se informa en las referencias 6 y 13. La sobreexpresión de TbpA ya se informa en las referencias 6, 13 y 14. La sobreexpresión de HmbR ya se informa en la referencia 15. La sobreexpresión de TbpB ya se informa en la referencia 14. La sobreexpresión de NspA ya se informa en la referencia 16, en combinación con inactivación de *porA* y *cps*. La sobreexpresión de Cu, Zn-superóxido dismutasa ya se informa en la referencia 14. La sobreexpresión de fHbp ya se informa en las referencias 2-4 y 9, y por un enfoque diferente (que expresa un FNR mutante constitutivamente activo) en las referencias 17 y 18.

En algunas realizaciones, una bacteria sobreexpresa NHBA, NadA y fHbp. Estos tres antígenos son componentes de la "vacuna universal" desvelada en la referencia 19 o "4CMenB" [20,21]. En una realización, la expresión de NHBA está controlada por un fuerte promotor, NadR es inactivado y la cepa expresa un FNR mutante constitutivamente activo. En otra realización, la expresión de NHBA está controlada por un fuerte promotor, la expresión de fHbp está controlada por un promotor, y fuerte NadR es inactivado. La bacteria es una bacteria que no expresa un MltA activo (GNA33), de modo que libera espontáneamente vesículas que contienen NadA y opcionalmente NHBA y fHbp. En el mejor de los casos, la bacteria no expresa un LPS nativo, por ejemplo, tiene un mutante o inactivación de LpxL1.

Vesículas

Los aspectos segundo y tercero de la invención proporcionan vesículas de membrana externa meningocócica. Estas vesículas de membrana externa incluyen cualquier vesícula proteoliposómica obtenida por rotura o formación de ampollas de una membrana externa meningocócica para formar vesículas a partir de ella que retienen antígenos de la membrana externa. Así, el término incluye, por ejemplo, VME (a veces denominadas "ampollas"), microvesículas

(MV [22]) y "VME nativos" ("VMEN" [23]).

Las VM y las NOVVM son vesículas de membrana que se producen de forma natural y se forman de forma espontánea durante el crecimiento bacteriano y se liberan en medio de cultivo. Las VM pueden obtenerse cultivando *Neisseria* en medio de cultivo en caldo, separando células enteras de las VM más pequeñas en el medio de cultivo en caldo (por ejemplo, mediante filtración o mediante centrifugación a baja velocidad para sedimentar solo las células y no las vesículas más pequeñas), y recogiendo a continuación VM del medio agotado en células (por ejemplo, por filtración, por precipitación diferencial o agregación de VM, por centrifugación a alta velocidad para sedimentar las VM). Las cepas para su uso en la producción de VM pueden seleccionarse generalmente basándose en la cantidad de VM producidas en cultivo, por ejemplo, las ref. 24 y 25 describen *Neisseria* con alta producción de VM.

5 Las VME se preparan artificialmente a partir de bacterias y se pueden preparar usando tratamiento con detergente (por ejemplo, con desoxicolato) o por medios sin detergente (por ejemplo, véase la referencia 26). Las técnicas para formar VME incluyen el tratamiento de bacterias con un detergente de sal de ácido biliar (por ejemplo, sales de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc., con el desoxicolato de sodio [27 y 28] siendo preferido para tratar *Neisseria*) a un pH suficientemente alto para no precipitar el detergente [29]. Otras técnicas pueden realizarse sustancialmente en ausencia de detergente [26] usando técnicas tales como sonicación, homogeneización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, trituración, prensa francesa, mezcla, etc. Los procedimientos que usan detergente sin o con bajo contenido pueden retener antígenos útiles, tales como NspA [26]. Por lo tanto, un procedimiento puede usar un tampón de extracción de VME con aproximadamente 0,5 % de desoxicolato o inferior, por ejemplo, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 %, <0,05 % o cero.

20 Un procedimiento útil para la preparación de VME se describe en la referencia 30 e implica la ultrafiltración en VME en bruto, en lugar de una centrifugación a alta velocidad. El procedimiento puede implicar una etapa de ultracentrifugación después de que tenga lugar la ultrafiltración.

25 Otro procedimiento útil para la producción de vesículas de membrana externa es inactivar el gen *mltA* en un meningococo, como se desvela en la referencia 31. Estas bacterias mutantes liberan espontáneamente vesículas en su medio de cultivo.

Cuando el lipooligosacárido (LOS) está presente en una vesícula, es posible tratar la vesícula para vincular sus componentes LOS y proteínas (conjugación "intravesicular" [43]).

30 Las vesículas pueden carecer de LOS por completo o pueden carecer de LOS hexa-acilados, por ejemplo, LOS en las vesículas puede tener un número reducido de cadenas de acilo secundarias por molécula de LOS [32]. Por ejemplo, las vesículas pueden provenir de una cepa que tiene una delección o mutación *lpxL1* que da como resultado la producción de un LOS penta-acilado [3,7]. Los LOS en una cepa pueden carecer de un epítipo de lacto-N-neotetraosa, por ejemplo, puede ser una cepa de inactivación de *Ist* y/o *IgtB* [6]. Los LOS pueden carecer de al menos un ácido graso primario unido a O de tipo salvaje [33]. LOS que tiene. El LOS puede no tener cadena α . El LOS puede comprender GlcNAc-Hep2fosfoetanolamina-KDO2-Lípido A [34].

35 Las vesículas pueden incluir uno, más de uno, o (preferentemente) cero serosubtipos de PorA. Se conoce la modificación del meningococo para proporcionar VME multi-PorA, por ejemplo, de las referencias 1 y 35. A la inversa, también se conoce la modificación para eliminar PorA, por ejemplo de la referencia 6.

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

40 La invención puede usar con mezclas de vesículas de diferentes cepas. Por ejemplo, la referencia 36 desvela una vacuna que comprende composiciones de vesículas meningocócicas multivalentes, que comprenden una primera vesícula derivada de una cepa meningocócica con un serosubtipo prevalente en un país de uso y una segunda vesícula derivada de una cepa que no necesita prevenir un serosubtipo en un país de uso. La referencia 37 también desvela combinaciones útiles de diferentes vesículas. Una combinación de vesículas de cepas de cada uno de los inmunotipos L2 y L3 se puede usar en algunas realizaciones.

45 **Bacterias**

Como se ha mencionado anteriormente, las VME de la invención se preparan a partir de meningococos que sobreexpresan los antígenos relevantes debido a la modificación genética. La invención también proporciona estas bacterias. Las bacterias se pueden usar para preparar VME de la invención.

50 Además de las modificaciones genéticas que causan la sobreexpresión de los antígenos de interés, las bacterias no expresan un MltA activo. Además, la bacteria puede incluir una o más modificaciones adicionales. Por ejemplo, la bacteria puede tener una inactivación de uno o más de *lpxL1*, *IgtB*, *porA*, *frpB*, *synX*, *IgtA* y/o *Ist*.

La bacteria puede tener niveles bajos de endotoxina, logrado por la inactivación de enzimas involucradas en la biosíntesis de LPS [38,39].

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

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

- 5 La bacteria puede ser de cualquier linaje adecuado, incluyendo los linajes hiperinvasivos e hipervirulentos, por ejemplo, cualquiera de los siguientes siete linajes hipervirulentos: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complejo ET-5; complejo ET-37; grupo A4; linaje 3. Estos linajes se han definido mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero la tipificación de secuencia multilocus (MLST) también se ha utilizado para clasificar los meningococos [ref. 40], por ejemplo, el complejo ET-37 es el complejo ST-11 de MLST, el complejo ET-5 es ST-32 (ET-5), el linaje 3 es ST-41/44, etc.

La bacteria puede incluir una o más mutaciones de inactivación y/o hiperexpresión desveladas en las referencias 16 y 41-43. Los genes adecuados para la modificación incluyen: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, Pi1C, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB [41]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB,

- 15 LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, Pi1C, PmrE, PmrF, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, Pi1C, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB; y (d) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, Opa, Opc, Pi1C, PorB, SiaD, SynA, SynB y/o SynC.

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

25 **Producción de cepas**

- La invención proporciona un procedimiento para preparar una cepa meningocócica adecuada para la preparación de VME, que comprende las etapas de (i) elegir una cepa de partida que exprese NadA y opcionalmente NHBA; y (ii) modificar la cepa de partida para aumentar la cantidad de NadA y opcionalmente NHBA que expresa, en el que el meningococo no expresa NadR y no expresa M1tA. La cantidad incrementada después de la modificación en la etapa (ii) es útil al menos 10 %, mayor que la primera cantidad, medido en masa del antígeno relevante por unidad de masa de bacteria y es más útil al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 100 % o más.

Los procesos pueden ser seguidos por una etapa de (iii) cultivar las bacterias modificadas obtenidas en la etapa (ii) para proporcionar un cultivo bacteriano.

- 35 La cepa también se puede modificar para aumentar o disminuir la expresión de otros polipéptidos, como se describe en otra parte del presente documento, por ejemplo, para aumentar su expresión de fHbp, tal como mediante la introducción de un gen que codifica un FNR mutante constitutivamente activo.

- La invención también proporciona un procedimiento para preparar una vesícula meningocócica, que comprende una etapa de tratamiento de un cultivo bacteriano obtenido mediante un procedimiento de la invención (como se ha descrito anteriormente) de modo que su membrana externa forme vesículas. Esta etapa de tratamiento puede usar cualquiera de las técnicas tratadas anteriormente.

Las cepas iniciales útiles se encuentran en el serogrupo B del meningococo. Cuatro cepas meningocócicas iniciales útiles para preparar bacterias que sobreexpresan un antígeno de interés son MC58, NZ05/33, H44/76 y GB013. MC58 tiene el serosubtipo PorA 1.7,16; NZ05/33 tiene el serosubtipo 1.7-2,4; H44/76 tiene el serosubtipo 1.7,16; y GB013 tiene el serosubtipo 1.22,9.

45 **Antígenos**

NHBA (antígeno de unión a heparina de Neisseria)

- NHBA [11] se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como gen NMB2132 (número de referencia de GenBank GI:7227388; SEQ ID NO: 9 en el presente documento). Desde entonces se han publicado secuencias de NHBA de muchas cepas. Por ejemplo, las formas alélicas de NHBA (denominadas proteína "287") se pueden ver en las figuras 5 y 15 de la referencia 44 y en el ejemplo 13 y la figura 21 de la referencia 45 (SEQ ID 3179 a 3184 en ellas). También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de NHBA.

Los antígenos de NHBA preferidos para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) con la secuencia de aminoácidos de la proteína "287" de la referencia 44.

95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO:9; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:9, en el que "n" es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO:9.

- 5 Los antígenos de NHBA más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9. Los antígenos NHBA ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

NadA (adhesina A de Neisseria)

- 10 El antígeno NadA se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como gen NMB1994 (número de referencia de GenBank GI:7227256; SEQ ID NO: 10 en el presente documento). Las secuencias de antígeno NadA de muchas cepas se han publicado desde entonces y la actividad de la proteína como una adhesina de Neisseria ha sido bien documentada. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de NadA.

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

Los antígenos NadA más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10. Los antígenos NadA ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto. SEQ ID NO: 6 es uno de tales fragmentos.

25 HmbR

- La secuencia de HmbR de longitud completa se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como gen NMB1668 (SEQ ID NO:7 en el presente documento). La referencia 46 informa una secuencia de HmbR de una cepa diferente (SEQ ID NO:8 en el presente documento), y la referencia 15 informa una secuencia adicional (SEQ ID NO:19 en el presente documento). Las SEQ ID NO: 7 y 8 difieren en longitud en 1 aminoácido y tienen una identidad del 94,2 %. La SEQ ID NO: 19 es un aminoácido más corta que la SEQ ID NO:7 y tienen un 99 % de identidad (una inserción, siete diferencias) mediante CLUSTALW. La invención puede usar cualquiera de tales polipéptidos HmbR.

- La invención puede usar un polipéptido que comprende una secuencia de HmbR de longitud completa, pero a menudo usará un polipéptido que comprende una secuencia de HmbR parcial. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una secuencia DE HmbR usada de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un *i*% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7, en la que el valor de *i* es 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o más. En otras realizaciones, una secuencia DE HmbR usada de acuerdo con la invención puede comprender un fragmento de al menos *j* aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:7, en la que el valor de *j* es 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más. En otras realizaciones, una secuencia DE HmbR usada de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos (*i*) que tiene al menos *i*% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 Y/O (II) que comprende un fragmento de al menos *j* aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:7.

- Los fragmentos preferidos de *j* aminoácidos comprenden un epítipo de la SEQ ID NO:7. Dichos epítopos habitualmente comprenderán aminoácidos que están ubicados en la superficie de HmbR. Los epítopos útiles incluyen aquellos con aminoácidos implicados en la unión de HmbR a la hemoglobina, ya que los anticuerpos que se unen a estos epítopos pueden bloquear la capacidad de una bacteria para unirse a la hemoglobina del huésped. La topología de HmbR, y sus restos funcionales críticos, se investigaron en la referencia 47. Los fragmentos que retienen una secuencia transmembrana son útiles, porque se pueden mostrar en la superficie bacteriana, por ejemplo, en vesículas. Los ejemplos de fragmentos largos de HmbR corresponden a las SEQ ID NO: 21 y 22. Si se usa HmbR soluble, sin embargo, se pueden usar secuencias que omiten la secuencia transmembrana, pero típicamente reteniendo el o los epítopos de la porción extracelular.

- Los antígenos HmbR más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7. Los antígenos HmbR ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

fHbp (proteína de unión al factor H)

El antígeno fHbp se ha caracterizado con detalle. También se ha conocido como proteína "741" [SEQ ID 2535 y 2536 en la ref. 45], "NMB1870", "GNA1870" [refs. 48-50], "P2086", "LP2086" u "ORF2086" [51-53]. Es naturalmente una lipoproteína y se expresa en todos los serogrupos meningocócicos. La estructura del dominio inmunodominante C-terminal de fHbp ("fHbpC") se ha determinado mediante RMN [54]. Esta parte de la proteína forma un barril β de ocho cadenas, cuyas hebras están conectadas por bucles de longitudes variables. El barril está precedido por una hélice α corta y una cola flexible N-terminal.

El antígeno fHbp se divide en tres variantes distintas [55] y se ha encontrado que el suero producido contra una familia dada es bactericida dentro de la misma familia, pero no es activo contra las cepas que expresan una de las otras dos familias, es decir, existe una protección cruzada intravariante, pero sin protección cruzada entre familias. La invención puede usar una única variante de fHbp, pero será útil incluir un fHbp de dos o tres de las variantes. Por lo tanto, puede usar una combinación de dos o tres fHbps diferentes, seleccionados de: (a) una primera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un $a\%$ de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:1; (b) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un $b\%$ de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:2; y/o (c) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un $c\%$ de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:3.

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

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

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

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

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

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

segundo polipéptidos tienen diferentes secuencias de aminoácidos.

Otra fHbp útil que puede usarse según la invención es una de las formas modificadas desveladas, por ejemplo, en la referencia 56, por ejemplo que comprende la SEQ ID NO:20 o 23. Estas formas modificadas pueden provocar respuestas de anticuerpos que son ampliamente bactericidas contra los meningococos.

- 5 Las proteínas fHbp en una VME generalmente estarán lipidadas, por ejemplo en una cisteína N-terminal. En otras realizaciones, no serán lipidadas.

NspA (proteína A de superficie de Neisseria)

- 10 El antígeno NspA se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como gen NMB0663 (número de referencia de GenBank GI:7225888; SEQ ID NO: 11 en el presente documento). El antígeno se conocía anteriormente de las referencias 57 y 58. Las secuencias de antígeno NspA de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de NspA.

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

- 20 Los antígenos NspA más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11. Los antígenos NspA ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

NhhA (homólogo hia de Neisseria)

- 25 El antígeno NhhA se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como gen NMB0992 (número de referencia de GenBank GI:7226232; SEQ ID NO: 12 en el presente documento). Las secuencias de antígeno NhhA de muchas cepas se han publicado desde, por ejemplo, las referencias 44 y 59, y se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de NhhA. También se conoce como Hsf.

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

- 35 Los antígenos NhhA más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:12. Los antígenos NhhA ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

App (proteína de adhesión y penetración)

- 40 El antígeno App se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como gen NMB1985 (número de referencia de GenBank GI:7227246; SEQ ID NO: 13 en el presente documento). Las secuencias de antígeno App de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se conoce como "ORF1" y "Hap". También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de App.

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

- 50 Los antígenos App más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13. Los antígenos App ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

Omp85 (proteína de membrana externa de 85 kDa)

El antígeno Omp85 se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B

meningocócico [68] como gen NMB0182 (número de referencia de GenBank GI:7225401; SEQ ID NO: 14 en el presente documento). Las secuencias de antígeno Omp85 de muchas cepas se han publicado desde entonces. Más información sobre Omp85 se puede encontrar en las referencias 60 y 61. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de Omp85.

- 5 Los antígenos Omp85 preferidos para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene un 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO:14; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:14, en el que "n" es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO:14.

Los antígenos Omp85 más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:14. Los antígenos Omp85 ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

15 TbpA

El antígeno TbpA se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como gen NMB0461 (número de referencia de GenBank GI:7225687; SEQ ID NO: 23 en el presente documento). Las secuencias de TbpA de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de TbpA.

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

Los antígenos TbpA más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23. Los antígenos TbpA ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

30 TbpB

El antígeno TbpB se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como el gen NMB1398 (número de referencia de GenBank GI:7225686; SEQ ID NO: 24 en el presente documento). Las secuencias de TbpB de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han notificado diversos fragmentos inmunógenos de TbpB.

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

Los antígenos TbpB más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24. Los antígenos TbpB ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

45 Cu,Zn-superóxido dismutasa

El antígeno de la Cu, Zn-superóxido dismutasa se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico [68] como gen NMB1398 (número de referencia de GenBank GI:7226637; SEQ ID NO: 25 en el presente documento). Las secuencias de Cu, Zn-superóxido dismutasa de muchas cepas se han publicado desde entonces. También se han informado varios fragmentos inmunogénicos de Cu, Zn-superóxido dismutasa.

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

preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO:25.

Los antígenos Cu, Zn-superóxido dismutasa más útiles pueden provocar anticuerpos que, después de la administración a un sujeto, pueden unirse a un polipéptido meningocócico que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:25. Los antígenos de Cu, Zn-superóxido dismutasa ventajosos para su uso con la invención pueden generar anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un sujeto.

Composiciones farmacéuticas

Las vesículas de la invención son útiles como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas inmunogénicas para la administración a un paciente. Estos incluirán típicamente un vehículo farmacéuticamente aceptable y una discusión exhaustiva de dichos vehículos está disponible en la referencia 62.

Los volúmenes de dosificación eficaces se pueden establecer de forma habitual, pero una dosis humana típica de la composición tiene un volumen de aproximadamente 0,5 ml, por ejemplo para inyección intramuscular. La vacuna basada en VEM RIVM se administró en un volumen de 0,5 ml [63] mediante inyección intramuscular en el muslo o el antebrazo. MeNZB™ se administra en una dosis de 0,5 ml mediante inyección intramuscular en la parte anterolateral del muslo o la región deltoides del brazo. Se pueden usar dosis similares para otras vías de administración, por ejemplo, una vacuna intranasal basada en VME para atomización puede tener un volumen de aproximadamente 100 µl o aproximadamente 130 µl por pulverización, con cuatro pulverizaciones administradas para dar una dosis total de aproximadamente 0,5 ml.

El pH de una composición de la invención está usualmente entre 6 y 8, y más preferentemente entre 6,5 y 7,5 (por ejemplo, aproximadamente 7). El pH de la vacuna basada en VME de RIVM es 7,4 [64], y, para las composiciones, se prefiere un pH <7,5. La vacuna basada en VME de RIVM mantiene el pH mediante el uso de un tampón Tris/HCl 10 mM, y el pH estable en las composiciones de la invención puede mantenerse mediante el uso de un tampón, por ejemplo, un tampón Tris, un tampón citrato, tampón fosfato o un tampón histidina. De este modo, generalmente, las composiciones de la invención incluyen un tampón.

La composición puede ser estéril y/o apirógena. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones de la invención para la administración a pacientes son inmunogénicas y, más preferentemente, son composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser o bien profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacuna comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno o antígenos, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo del estado de salud y físico del individuo que se vaya a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica por parte del médico encargado del tratamiento y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de pruebas habituales. El contenido de antígeno de las composiciones de la invención se expresará, generalmente, en términos de la cantidad de proteína por dosis. Una dosis de aproximadamente 0,9 mg de proteína por ml es típica para las vacunas intranasales basadas en VME.

Las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante inmunológico. Por consiguiente, por ejemplo, pueden incluir un adyuvante de sal de aluminio o una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una emulsión de escualeno en agua). Las sales de aluminio adecuadas incluyen hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), (por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia 65), o mezclas de los mismos. Las sales pueden asumir cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), prefiriéndose la adsorción de antígeno a la sal. La concentración de A1⁺⁺⁺ en una composición para la administración a un paciente es, preferentemente, inferior a 5 mg/ml, por ejemplo, ≤4 mg/ml, ≤3 mg/ml, ≤2 mg/ml, ≤1 mg/ml, etc. Un intervalo preferente es entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0,85 mg/dosis. Los adyuvantes de hidróxido de aluminio son particularmente adecuados para su uso con vacunas contra el meningococo.

Los meningococos afectan a varias zonas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención se pueden preparar en varias formas líquidas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones. La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, en forma de un inhalador, usando un aerosol fino. La composición puede prepararse para administración nasal, administración auditiva u ocular, por ejemplo, como pulverizador o gotas. Son típicos los inyectables para administración intramuscular.

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se envasa en formato de dosis múltiple. Los antimicrobianos, tal como el tiomersal y el 2-fenoxietanol, se encuentran habitualmente en las vacunas, pero se prefiere usar un conservante sin mercurio o ningún conservante.

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

5 Las composiciones de la invención pueden incluir detergente residual (por ejemplo, desoxicolato) de la preparación de VME. La cantidad de detergente residual es, preferentemente, inferior a 0,4 µg (más preferentemente inferior a 0,2 µg) por cada µg de proteína MenB.

Si una composición de la invención incluye LOS, la cantidad de LOS es, preferentemente, inferior a 0,12 µg (más preferentemente inferior a 0,05 µg) por cada µg de proteína.

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

10 **Uso en tratamiento**

15 La invención también proporciona una composición farmacéutica inmunogénica como se ha descrito anteriormente para su uso en un procedimiento para elevar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar una composición de la invención al mamífero. Preferentemente, la respuesta inmunitaria es protectora y, preferentemente, implica la aparición de anticuerpos. El procedimiento puede generar una respuesta de refuerzo en un paciente que ya ha sido sensibilizado contra *N. meningitidis*.

El mamífero es preferentemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna destinada a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad, etc.

20 La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como medicamentos. Preferentemente, el medicamento es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es, más preferentemente, una vacuna.

Estos usos y procedimientos son, preferentemente, para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por *N. meningitidis*, por ejemplo, meningitis bacteriana (o, más específicamente, meningocócica) o septicemia.

25 Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por *Neisseria* tras la administración de la composición de la invención. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias contra los antígenos básicos tras la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención se puede determinar administrándolas a sujetos de ensayo (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad o modelos animales [66]) y determinando a continuación parámetros estándar que incluyen anticuerpos bactericidas en suero (SBA) y títulos de ELISA (GMT). Estas respuestas inmunitarias generalmente se determinarán alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un aumento de SBA de al menos 4 veces u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, se puede hacer más de una determinación posterior a la administración.

35 En general, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos después de su administración a un sujeto. Estas respuestas se miden de forma conveniente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna. La actividad bactericida en suero (ABS) mide la muerte de bacterias mediada por el complemento y se puede analizar usando complemento humano o de cachorro de conejo. Las normas de la OMS requieren que una vacuna induzca al menos una elevación multiplicada por 4 de la ABS en más del 90 % de los receptores. MeNZB™ produce un aumento de 4 veces la ABS 4-6 semanas después de la administración de la tercera dosis.

40 Las composiciones preferidas pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente sujeto humano que es superior al criterio para seroprotección para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado por encima del cual se considera que un huésped está seroconvertido contra el antígeno son bien conocidos, y dichos títulos son publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente, más del 80 % de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertida, más preferentemente más del 90 %, aún más preferentemente más del 93 % y de la forma más preferente del 96-100 %.

45 En general, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede llevarse a cabo mediante inyección parenteral (por ejemplo por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido), o por cualquier otra vía adecuada. La invención puede usarse para generar inmunidad sistémica y/o mucosa. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero también se puede usar como alternativa la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular habitual es de 0,5 ml.

55 El tratamiento de dosificación puede ser una pauta en una sola dosis o una pauta en múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. Una pauta de

dosis primaria puede ir seguida por una pauta de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas) y entre la sensibilización y el refuerzo, se puede determinar de manera rutinaria. La vacuna RIVM basada en VME se probó utilizando un esquema primario de 3 o 4 dosis, con vacunación a 0, 2 y 8 o 0, 1, 2 y 8 meses. MeNZB™ se administra en tres dosis a intervalos de seis semanas.

- 5 Las composiciones de la invención pueden usarse para inducir respuestas de anticuerpos bactericidas contra más de un linaje hipervirulento de meningococo. En particular, preferentemente pueden inducir respuestas bactericidas contra dos o tres de los siguientes tres linajes hipervirulentos: (i) grupo A4; (ii) complejo ET5; y (iii) linaje 3. Además, pueden inducir respuestas de anticuerpos bactericidas contra uno o más de los linajes hipervirulentos del subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y contra otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Esto no significa necesariamente que la composición pueda inducir anticuerpos bactericidas contra todas y cada una de las cepas de meningococo dentro de estos linajes hipervirulentos, por ejemplo, más bien, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas de meningococo dentro de un linaje hipervirulento particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos el 50 % (por ejemplo, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) del grupo. Los grupos de cepas preferidos incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los países siguientes: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. El suero tiene, preferentemente, un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2¹⁰, 2¹¹, 2¹², 2¹³, 2¹⁴, 2¹⁵, 2¹⁶, 2¹⁷, 2¹⁸ o mayor, preferentemente al menos 2¹⁴) por ejemplo, el suero puede matar al menos el 50 % de las bacterias de prueba de una cepa particular cuando se diluye 1/1024.

- 20 Las composiciones útiles pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas siguientes de meningococo del serogrupo B: (i) del grupo A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21,16) y/o cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5, cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) y/o cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o cepa BZ198 (B:NT:-). Las composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas 961-5945, 44/76 y 394/98.

- 25 Las cepas 961-5945 y G2136 son las dos cepas de referencia de *Neisseria* MLST [ids 638 y 1002 en la referencia 67]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (por ejemplo, ATCC BAA-335) y fue la cepa secuenciada en la referencia 68. La cepa 44/76 ha sido ampliamente utilizada y caracterizada (por ejemplo, ref.69) y es una de las cepas de referencia de *Neisseria* MLST [id 237 en la ref. 67; fila 32 de la tabla 2 en la ref. 40]. Originalmente, la cepa 394/98 se aisló en Nueva Zelanda en 1998 y se han publicado varios estudios usando esta cepa (por ejemplo, refs. 70 y 71). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia MLST (id 409 en la ref. 67; fila 41 de la tabla 2 en la ref. 40).

Componentes antigénicos adicionales

Además de las vesículas de la invención, una composición inmunogénica puede incluir antígenos adicionales.

- 30 Una composición puede incluir uno o más sacáridos capsulares de meningococos, por ejemplo, de los serogrupos A, C, W135 y/o Y. Estos sacáridos generalmente se conjugarán con un portador de proteínas. Una composición de la invención puede incluir uno o más conjugados de sacáridos capsulares de 1, 2, 3 o 4 de serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, por ejemplo, A + C, A + W135, A + Y, C+W135, C+Y, W135 + Y, A + C + W135, A + C + Y, A + W135 + Y, A + C + W135 + Y, etc. Componentes que incluyen sacáridos de los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y son ideales.

Además de contener antígenos de *N. meningitidis*, las composiciones pueden incluir antígenos de otros patógenos. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, tal como un sacárido (típicamente conjugado)
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como el antígeno de superficie HBsAg.
- 40 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.
- un antígeno de difteria, tal como un toxoide diftérico.
- un antígeno del tétanos, tal como un toxoide tetánico.
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B (Hib), típicamente conjugado.
- 45 - antígenos del poliovirus inactivados.

- En los casos en los que se incluye un antígeno de difteria en la composición, se prefiere incluir también un antígeno del tétanos y antígenos de la tos ferina. De manera similar, en los casos en los que se incluye un antígeno del tétanos, se prefiere incluir también antígenos de tos ferina. De manera similar, en los casos en los que se incluye un antígeno de tos ferina, se prefiere incluir también antígenos de difteria y tétanos. Por lo tanto, se prefieren las combinaciones de DTP.

- Si se incluye un sacárido Hib (típicamente como un conjugado), el resto sacárido puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato de polirribosilribitol (PRP) de longitud completa purificado de bacterias), pero también es posible fragmentar el sacárido purificado para producir oligosacáridos (por ejemplo, PM de ~ 1 a ~ 5 kDa) por ejemplo por hidrólisis. La concentración de conjugado de Hib en una composición generalmente estará en el intervalo de 0,5 µg a 50 µg, por ejemplo, de 1-20 µg, de 10-15 µg, de 12-16 µg, etc. La cantidad puede ser de aproximadamente 15 g, o aproximadamente 12,5 µg en algunas realizaciones. Puede ser adecuada una masa de menos de 5 µg [72] por ejemplo, en el intervalo de 1-5 µg, 2-4 µg, o aproximadamente 2,5 µg. Tal como se ha descrito anteriormente, en combinaciones que incluyen sacárido Hib y sacáridos meningocócicos, la dosis del primero puede seleccionarse en

función de la dosis del segundo (en particular, con múltiples serogrupos meningocócicos, su masa media). Otras características de los conjugados de Hib son como se ha desvelado anteriormente para los conjugados meningocócicos, incluida la elección de la proteína transportadora (por ejemplo, CRM197 o toxoide tetánico), enlaces, relaciones, etc.

- 5 Si se incluye un antígeno de *S.pneumoniae*, esto puede ser un polipéptido o un sacárido. Los sacáridos capsulares conjugados son particularmente útiles para inmunizar contra neumococos. El sacárido puede ser un polisacárido que tiene el tamaño que surge durante la purificación del sacárido de la bacteria o puede ser un oligosacárido logrado por fragmentación de dicho polisacárido. En el producto heptavalente PREVNAR™, por ejemplo, 6 de los sacáridos se presentan como polisacáridos intactos, mientras que uno (el serotipo 18C) se presenta como un oligosacárido. Una composición puede incluir un sacárido capsular de uno o más de los siguientes serotipos neumocócicos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y/o 33F. Una composición puede incluir múltiples serotipos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más serotipos. Las combinaciones conjugadas 7-valente, 9-valente, 10-valente, 11-valente y 13-valente ya son conocidas en la técnica, así como una combinación no conjugada 23-valente. Por ejemplo, una combinación 10-valente puede incluir sacáridos de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una combinación 11-valente puede incluir además sacárido del serotipo 3. Una combinación 12-valente puede añadir a la mezcla 10-valente: serotipos 6A y 19A; 6A y 22F; 19A y 22F; 6A y 15B; 19A y 15B; r 22F y 15B; Una combinación 13-valente puede añadir a la mezcla 11-valente: serotipos 19A y 22F; 8 y 12F; 8 y 15B; 8 y 19A; 8 y 22F; 12F y 15B; 12F y 19A; 12F y 22F; 15B y 19A; 15B y 22F. etc. Las características adicionales de los conjugados neumocócicos son las desveladas anteriormente para los conjugados meningocócicos., incluida la elección de la proteína transportadora (por ejemplo, CRM197 o toxoide tetánico), enlaces, relaciones, etc. Cuando una composición incluye más de un conjugado, cada conjugado puede usar la misma proteína transportadora o una proteína transportadora diferente. La referencia 73 describe posibles ventajas a la hora de usar proteínas vehículo diferentes en vacunas conjugadas neumocócicas multivalentes.

General

- 25 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra cosa, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, por ejemplo, las referencias 74-80, etc.

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

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

- En los casos en los que la invención se refiera a un "epítipo", este epítipo puede ser un epítipo de linfocitos B y/o un epítipo de linfocitos T, pero generalmente será un epítipo de células B. Dichos epítipos pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [81,82] o procedimientos similares) o pueden predecirse (por ejemplo, usando el índice antigénico de Jameson-Wolf [83], estrategias basadas en matriz [84], MAPITOPE [85], TEPITOPE [86,87], redes neurales [88], OptiMer y EpiMer [89, 90], ADEPT [91], Tsites [92], hidrofilia [93], índice antigénico [94] o los procedimientos desvelados en las referencias 95-99, etc.). Los epítipos son partes de un antígeno que son reconocidos por y se unen a los sitios de unión a antígeno de anticuerpos o receptores de linfocito T y también pueden citarse como "determinantes antigénicos".

- 40 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, el porcentaje de aminoácidos que son iguales al comparar las dos secuencias. Pueden determinarse este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la ref. 100. Se determina un alineamiento preferido mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de hueco afín con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se desvela en la ref. 101.

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

Breve descripción de los dibujos

- 50 La Figura 1 ilustra el enfoque para construir un panel isogénico inactivando *nadA* y *nhba* (GNA2132) para crear una cepa de fondo. La Figura 2 muestra la inserción de genes *fHbp* en la cepa de fondo para hacer un panel de cepas isogénicas que expresan diferentes genes *fHbp* bajo el control de un promotor Ptac.

La Figura 3 muestra los niveles de expresión de *fHbp* en las cepas de panel isogénicas descritas en la Figura 2.

- 55 La Figura 4 muestra la expresión de *NadA* (panel superior) y *NadR* (panel inferior) en ocho cepas de tipo salvaje (Figura 4A) o sus formas de inactivación de *NadR* (Figura 4B). Los números en la Figura 4A muestran el número de repeticiones de tetranucleótidos TAAA en la cepa. La Figura 4C muestra la expresión de *NadA* y *NadR* en 7

cepas, en presencia de ausencia de 4HPA.

La Figura 5 muestra (A) cepa de inicio MC58 (B) MC58 Δ nhba y (C) MC58 Δ nhba transformada con un gen de nhba complementario con un promotor inducible por CREM e IPTG corriente arriba.

5 La Figura 6 muestra la expresión de NHBA por MC58 y cepas derivadas. Los dos carriles izquierdos muestran expresión en MC58 y MC58 Δ nhba. Los siguientes 8 carriles muestran expresión en cepas complementadas a cuatro concentraciones de IPTG. Los carriles están dispuestos en pares, siendo el carril de la derecha una cepa complementada con *nhba* que tiene un CREM corriente arriba.

10 La Figura 7 muestra la expresión de NHBA por 95N477 y cepas derivadas. Los dos carriles izquierdos muestran expresión en 95N477 y 95N477 Δ nhba. Los siguientes 5 carriles muestran expresión en cepas complementadas a las concentraciones indicadas de IPTG.

La Figura 8 muestra la expresión de NHBA para cinco cepas en un panel isogénico. De arriba a abajo, el NHBA expresado es de la cepa NZ98/254, UK013, UK355, 2996 y NM117.

Modos para llevar a cabo la invención

NHBA

15 El gen *nhba* endógeno se inactiva en varias cepas del serogrupo B para crear cepas MC58 Δ nhba, 95N477 Δ nhba, NGH38 Δ nhba y UK013 Δ nhba. Estas cepas se transforman luego con el vector pCOMPpind-287 que contiene un gen que codifica *nhba* de la cepa 394/98, con o sin un CREM corriente arriba (elemento regulador de contacto de Neisseria), bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Los vectores insertan el gen *nhba* (\pm CREM) entre los genes endógenos *nmb1428* y *nmb1429* por recombinación homóloga.

20 La Figura 5 muestra la cepa MC58 inicial, la cepa MC58 Δ nhba y la cepa MC58 complementada (+ CREM). La Figura 6 muestra la expresión de NHBA por las diversas cepas de MC58 con una concentración creciente de IPTG. Las cepas complementadas muestran altos niveles de expresión inducible de NHBA, con los niveles más altos vistos con el gen insertado que tiene un CREM aguas arriba.

25 La Figura 7 muestra la expresión en las cepas 95N477. El gen *nhba* endógeno en esta cepa codifica una proteína 427aa, mientras que el gen complementario insertado tiene 492aa. Los niveles de expresión aumentados de la proteína NHBA más grande son claramente visibles, y esta expresión aumenta con la concentración de IPTG.

Aunque en algunas cepas (por ejemplo, M4407) no fue posible obtener una inactivación de Δ nhba usando los protocolos de transformación, para las cepas que podrían transformarse, estos resultados muestran que pueden obtenerse fácilmente cepas que sobreexpresan NHBA.

NadR (NMB1843)

30 El gen *nadA* está presente en aproximadamente el 50% de los aislamientos meningocócicos. NadA exhibe expresión dependiente de la fase de crecimiento, con niveles máximos en la fase de crecimiento estacionario de todas las cepas analizadas. La expresión está controlada por una repetición de tetranucleótidos (TAAA) ubicada corriente arriba del promotor *nadA*. El número de repeticiones se puede modificar durante la replicación a través del mal emparejamiento de la cadena deslizada y, en consecuencia, puede influir en la expresión del gen *nadA* creando variantes en las que los cambios en el número de repeticiones dan como resultado promotores con actividad baja, media o alta.

35 Un área del promotor *nadA* aguas arriba de la repetición TAAA, es responsable de la represión de la expresión de *nadA* durante la fase logarítmica de crecimiento. Esta área se llama la "región GPR". El fraccionamiento por afinidad de ADN identificó una proteína presente en los extractos crudos de meningococo que se une a la región GPR. Esta proteína es NadR (NMB1843) y es miembro de la familia de represores MarR. NadR se une a tres operadores (sitios de unión) en el promotor *nadA* y da como resultado la represión de la expresión de NadA. La inactivación de NadR en cepas que expresan niveles altos, medios o bajos de NadA da como resultado una expresión de alto nivel casi comparable en cada cepa. Por lo tanto, NadR es el represor que contribuye a los niveles de expresión diferencial exhibidos por las cepas meningocócicas, o variantes de fase en la misma cepa, con diferentes números de repeticiones en su promotor. NadR se expresa a niveles similares en diferentes cepas pero puede reprimir más o menos eficientemente el promotor *nadA* dependiendo del número de repeticiones presentes en el promotor variante.

40 La eliminación de NadR en diversos antecedentes de meningococo produce niveles de expresión de NadA casi comparables en todo el panel. Las cepas se transforman con la construcción de inactivación para el reemplazo alélico de *nmb1843* con un casete de cloranfenicol. Los niveles de expresión en ocho cepas diferentes se muestran en la Figura 4.

50 Un ligando de molécula pequeña de ácido 4-hidroxifenilacético (4HPA) puede inducir la expresión de NadA *in vitro* debido a la desrepresión de NadR (Figura 4C). La adición de la molécula a la proteína NadR purificada *in vitro* puede inhibir la actividad de unión de la proteína para el promotor *nadA*. 4HPA es un metabolito de la vía catabólica de los aminoácidos aromáticos y se secreta en la saliva y la orina humanas, por lo que la expresión *in vivo* de NadA puede

ser mayor que la observada durante el crecimiento *in vitro*.

Así, las cepas que sobreexpresan NadA pueden obtenerse fácilmente mediante la inactivación de NadR y/o mediante la adición de un inductor de molécula pequeña al medio de crecimiento.

Panel isogénico - NHBA

- 5 NHBA es un antígeno en el producto 4CMenB. Se usó un panel isogénico para estudiar la posible protección cruzada de los anticuerpos bactericidas inducidos por NHBA.

10 Los genes *nhba* de seis cepas meningocócicas diferentes se amplificaron para proporcionar la forma madura del polipéptido con una etiqueta de histidina C-terminal. Estos se clonaron en el vector plasmídico pET-21b+ y se expresaron en *E. coli*. Los péptidos NHBA purificados se usaron luego para inmunizar ratones (dosis de 20 µg) y obtener antisueros de ratón. Se realizaron ensayos ELISA para confirmar la presencia de anticuerpos en todos los sueros de ratón obtenidos.

15 Para evaluar la inmunogenicidad y la contribución de la variabilidad de la secuencia de aminoácidos a la cobertura de la vacuna, se diseñó una cepa de partida para que fuera susceptible a la muerte bactericida solo por anticuerpos anti-NHBA (en lugar de los otros antígenos en 4CMenB). La cepa 5/99 de *N. meningitidis* expresa de forma natural niveles altos de NadA, pero niveles muy bajos de NHBA y fHbp. Sus genes *nadA* y *nhba* fueron reemplazados respectivamente por los casetes de resistencia *ery* y *kan* (5/99ΔΔ). El gen *nhba* que se complementará se insertó en la región intergénica entre los marcos de lectura abiertos *nmb1428* y *nmb1429*. Por lo tanto, el panel de cepa final era isogénico, excepto el gen *nhba* elegido y este gen debería ser inducible para la expresión a niveles iguales en todos los miembros del panel.

20 Mediante FACS se demostró que los miembros del panel mostraban una cantidad comparable de los diferentes polipéptidos NHBA en cada cepa (Figura 8). Se analizaron varios antisueros de ratón generados contra los diferentes polipéptidos de NHBA en Western blot y la detección parecía ser específica de la variante, mostrando un reconocimiento más fuerte para la variante homóloga.

25 El panel también se usó para probar el efecto bactericida de los antisueros de ratón. Como las cepas eran isogénicas, cualquier diferencia en el efecto bactericida debería surgir solo de los diferentes polipéptidos NHBA expresados. Paralelamente, los sueros se probaron frente a cepas de tipo salvaje que expresan la secuencia de polipéptidos de NHBA relevante, para ver si el fondo genético común del panel isogénico permitió la detección de diferencias que serían ocultadas por la variación natural si se usaran cepas de tipo salvaje. Los resultados fueron los siguientes:

Antisuero NHBA	5/99ΔΔ	Tipo silvestre
NZ98/254	>8192	8192
MC58	8192	512
UK013	256	128
UK355	128	256
2996	128	256
NM117	2048	4096

30 Por lo tanto, el panel parece compensar la variabilidad que no está relacionada con el antígeno NHBA mismo. Por ejemplo, el suero producido contra la secuencia MC58 es mucho más efectivo contra el polipéptido MC58 en el panel isogénico que contra la cepa MC58 de tipo salvaje.

Panel isogénico - fHbp

35 La secuenciación del gen fHbp en una gran colección de aislados meningocócicos reveló tres variantes con bajos niveles de respuesta bactericida de protección cruzada. Se usó un ensayo bactericida en suero para evaluar las capacidades de protección cruzada de los anticuerpos humanos generados contra diferentes variantes de fHbp, pero la muerte mediada por anticuerpos bactericidas en este ensayo depende de varios factores. Por lo tanto, la cobertura potencial de un solo antígeno puede ser difícil de estimar.

40 Se utilizó un enfoque genético para superar la variabilidad debido a la susceptibilidad sérica específica de la cepa, limitaciones de fuentes de complemento compatibles y expresión variable de fHbp y otros factores expuestos a la superficie que afectan a la resistencia al suero (por ejemplo, la cápsula). Se diseñó un aislado meningocócico bien caracterizado (5/99) para generar cepas isogénicas que expresaran diez subvariantes fHbp diferentes de un promotor heterólogo constitutivo. Los genes fHbp se insertaron entre los genes endógenos *nmb1428* y *nmb1429*. Este panel se usó después como la cepa de prueba en un ensayo de anticuerpos bactericidas en suero (SBA) para evaluar la capacidad de una única variante de fHbp para provocar una respuesta inmune ampliamente protectora.

45 Para tener un fondo genético para expresar diferentes subvariantes de fHbp sin la acción interferente de los otros antígenos, los genes *nadA* y *nhba* en la cepa inicial 5/99 se inactivaron mediante la inserción de los casetes de resistencia *erm* y *kan*, respectivamente (Figura 1). La cepa mutante doble resultante (denominada 5/99ΔΔ) se manipuló para expresar diferentes subvariantes de fHbp bajo el control de un promotor Ptac para estandarizar la

cantidad de fHbp expresada (Figuras 1 y 2). En total, se clonaron diez secuencias diferentes de codificación de fHbp en el vector pComp-RBS y se transfirieron al fondo genético 5/99 $\Delta\Delta$.

5 Para evaluar la expresión de fHbp en las cepas recombinantes, los inventores realizaron un análisis FACS utilizando un suero policlonal de ratón contra una única variante de fHbp. El análisis mostró una cantidad comparable de las diferentes subvariantes de fHbp en la superficie de las cepas recombinantes generadas (Figura 3).

10 Las cepas recombinantes se analizaron para determinar su susceptibilidad a la muerte por anticuerpos bactericidas de ratones en un SBA usando complemento de conejo. Los sueros agrupados de ratones inmunizados con la "vacuna universal" de referencia 19 o con su componente GNA2091-fHbp se analizaron para determinar su capacidad para matar el tipo salvaje 5/99, la cepa intermedia 5/99 $\Delta\Delta$ que no expresa antígenos NHBA ni NadA, y las diez cepas recombinantes. La cepa 5/99 se destruyó por sueros criados contra la vacuna universal, pero no por sueros generados contra el antígeno único GNA2091-fHbp. La cepa 5/99 $\Delta\Delta$ fue resistente a la muerte por todos los sueros. Todas las cepas complementadas, excepto una, mostraron una susceptibilidad significativa a los sueros derivados de ratones inmunizados con la vacuna universal o con el antígeno GNA2091-fHbp. La única cepa sobreviviente expresó un fHbp en la familia III, confirmando la ausencia de reactividad cruzada entre las familias de fHbp. Las nueve cepas
15 susceptibles confirman que la secuencia específica de fHbp en la vacuna universal puede generar anticuerpos que son ampliamente protectores en toda la familia de fHbp I.

El panel también se analizó utilizando sueros obtenidos de adultos humanos que fueron inmunizados con 4CMenB. Los resultados fueron comparables a los observados con ratones.

Referencias

- 20 [1] Claassen y col. (1996) *Vaccine* 14:1001-8.
[2] Koeberling y col. (2007) *Vaccine* 25:1912-20.
[3] Koeberling y col. (2008) *J Infect Dis* 198:262-70.
[4] Hou y col. (2005) *J Infect Dis* 192:580-90.
[5] Documento WO2009/038889.
- 25 [6] Bonvehí y col. (2010) *Clin Vacc Immunol* 17:1460-6.
[7] Zollinger y col. (2010) *Vaccine* 28:5057-67.
[8] Documento WO2004/015099.
[9] Documento WO2006/081259.
[10] Deghmane y col. (2003) *Infect Immun* 71:2897-901.
- 30 [11] Serruto y col. (2010) *PNAS USA* 107:3770-5.
[12] Schielke y col. (2009) *Mol Microbiol* 72:1054-67.
[13] Documento WO2004/014418.
[14] Documento WO00/25811.
[15] Documento WO2010/070453.
- 35 [16] Documento WO02/09746.
[17] Oriente y col. (2010) *J Bacteriol* 192:691-701.
[18] Solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/247.428.
[19] Giuliani y col. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103(29): 10834-9.
[20] Donnelly y col. (2010) *PNAS USA* 107:19490-5.
- 40 [21] Kimura y col. (2010) *Clin Vaccine Immunol*. 2010 PMID: 21177912.
[22] Documento WO02/09643.
[23] Katial y col. (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
[24] Patente de los Estados Unidos 6.180.111.

- [25] Documento WO01/34642.
- [26] Documento WO2004/019977.
- [27] Patente europea 0011243.
- [28] Fredriksen y col. (1991) NIPH Ann. 14(2):67-80.
- 5 [29] Documento WO01/91788.
- [30] Documento WO2005/004908.
- [31] Documento WO2006/046143.
- [32] Documento WO00/26384.
- [33] Documento US-6531131
- 10 [34] Documento US-6645503
- [35] de Kleijn y col. (2000) Vaccine 18:1456-66.
- [36] Documento WO03/105890.
- [37] Documento WO2006/024946
- [38] Documento WO99/10497.
- 15 [39] Steeghs y col. (2001) The EMBO Journal 20:6937-6945.
- [40] Maiden y col. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- [41] Documento WO01/09350.
- [42] Documento WO02/062378.
- [43] Documento WO2004/014417.
- 20 [44] Documento WO00/66741.
- [45] Documento WO99/57280
- [46] Documento US-5/698.438.
- [47] Perkins-Balding y col. (2003) Microbiology 149:3423-35.
- [48] Massignani y col. (2003) J Exp Med 197:789-799.
- 25 [49] Welsch y col. (2004) J Immunol 172:5605-15.
- [50] Hou y col. (2005) J Infect Dis 192(4):580-90.
- [51] Documento WO03/063766.
- [52] Fletcher y col. (2004) Infect Immun 72:2088-2100.
- [53] Zhu y col. (2005) Infect Immun 73(10):6838-45.
- 30 [54] Cantini y col. (2006) J. Biol. Chem. 281:7220-7227
- [55] Documento WO2004/048404
- [56] Documento WO2009/104097.
- [57] Martin y col. (1997) J Exp Med 185(7):1173-83.
- [58] Documento WO96/29412.
- 35 [59] Documento WO01/55182.
- [60] Documento WO01/38350.
- [61] Documento WO00/23595.

- [62] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [63] Informe RIVM 124001 004.
- [64] Informe RIVM 000012 003.
- [65] Vaccine Design... (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- 5 [66] Documento WO01/30390.
- [67] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- [68] Tettelin y col. (2000) Science 287:1809-1815.
- [69] Pettersson y col. (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
- 10 [70] Welsch y col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. El antígeno derivado del genoma (GNA) 2132 provoca anticuerpos séricos protectores contra las cepas de Neisseria meningitidis de los grupos B y C.
- [71] Santos y col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Respuestas bactericidas en suero en macacos rhesus inmunizados con nuevas vacunas que contienen proteínas recombinantes derivadas del genoma de N. meningitidis.
- 15 [72] Documento WO2007/000327.
- [73] Documento WO2007/071707
- [74] Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [75] Handbook of Experimental Immunology, Vol. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- 20 [76] Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [77] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [78] Ausubel y col. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).
- [79] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)
- 25 [80] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [81] Geysen y col. (1984) PNAS USA 81:3998-4002.
- [82] Carter (1994) Methods Mol Biol 36:207-23.
- [83] Jameson, BA y col. 1988, CABIOS 4(1):181-186.
- [84] Raddrizzani y Hammer (2000) Brief Bioinform 1(2):179-89.
- 30 [85] Bublil y col. (2007) Proteins 68(1):294-304.
- [86] De Lalla y col. (1999) J. Immunol. 163:1725-29.
- [87] Kwok y col. (2001) Trends Immunol 22:583-88.
- [88] Brusica y col. (1998) Bioinformatics 14(2): 121-30
- [89] Meister y col. (1995) Vaccine 13(6):581-91.
- 35 [90] Roberts y col. (1996) AIDS Res Hum Retroviruses 12(7):593-610.
- [91] Maksyutov y Zagrebelnaya (1993) Comput Appl Biosci 9(3):291-7.
- [92] Feller y de la Cruz (1991) Nature 349(6311):720-1.
- [93] Hopp (1993) Peptide Research 6:183-190.
- [94] Welling y col. (1985) FEBS Lett. 188:215-218.

[95] Davenport y col. (1995) Immunogenetics 42:392-297.

[96] Tsurui y Takahashi (2007) J Pharmacol Sci. 105(4):299-316.

[97] Tong y col. (2007) Brief Bioinform. 8(2):96-108.

[98] Schirle y col. (2001) J Immunol Methods. 257(1-2):1-16.

5 [99] Chen y col. (2007) Amino Acids 33(3):423-8.

[100] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Suplemento 30

[101] Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

10 <120> DESARROLLOS DE LAS VESICULAS DE MEMBRANA EXTERIOR MENINGOCÓCICA

<130> P057283WO

<140> PCT/IB2011/

<141> 10/09/2011

15 <150> US 61/381.859

<151> 10/09/2010

<150> US 61/429.673

<151> 04/01/2011

<160> 25

<170> SeqWin99, versión 1.02

20 <210> 1

<211> 248

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

ES 2 759 484 T3

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

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

5

ES 2 759 484 T3

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

<210> 3
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 3

5

ES 2 759 484 T3

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

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

5

<220>
 <223> Antígeno meningocócico híbrido

<400> 4
 Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15

ES 2 759 484 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys
 340 345 350

Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
 355 360 365

ES 2 759 484 T3

Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala
 370 375 380

Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 385 390 395 400

Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 405 410 415

Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
 420 425 430

Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 435 440 445

Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460

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

Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495

Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510

Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
 515 520 525

Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540

Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
 545 550 555 560

Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
 565 570 575

Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
 580 585 590

Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
 595 600 605

Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620

Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640

Ala Ala Lys Gln

<210> 5
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Antígeno meningocócico híbrido
 <400> 5

ES 2 759 484 T3

Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala

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

ES 2 759 484 T3

Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu
355 360 365

Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His
370 375 380

Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser
385 390 395 400

Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser
405 410 415

Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala
420 425 430

Lys Gln

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 6

ES 2 759 484 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Thr Ala Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln
180 185 190

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

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

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

Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu
245 250 255

Glu Ser Asp Ser Lys Phe Val Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr
260 265 270

Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp
275 280 285

His Asp Thr Arg Leu Asn Gly Leu Asp Lys Thr Val Ser Asp Leu Arg
290 295 300

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

Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly
325

ES 2 759 484 T3

<211> 792
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 7

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Asn Thr Leu Gly Phe Gly Val Ser Asn Asp Arg Val Asp Ala Ala

```

5

ES 2 759 484 T3

	195						200						205			
Leu	Leu	Tyr	Ser	Gln	Arg	Arg	Gly	His	Glu	Thr	Glu	Ser	Ala	Gly	Asn	
	210						215						220			
Arg	Gly	Tyr	Ala	Val	Glu	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Arg	Gly	
225					230					235					240	
Ser	Ala	Arg	Gly	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Lys	His	Lys	Tyr	Asn	His	His	
				245					250					255		
Ala	Leu	Gly	Lys	Ile	Ala	Tyr	Gln	Ile	Asn	Asp	Asn	His	Arg	Ile	Gly	
			260					265					270			
Ala	Ser	Leu	Asn	Gly	Gln	Gln	Gly	His	Asn	Tyr	Thr	Val	Glu	Glu	Ser	
		275					280						285			
Tyr	Asn	Leu	Thr	Ala	Ser	Ser	Trp	Arg	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Asn	Arg	
	290					295					300					
Arg	Arg	Asn	Ala	Asn	Leu	Phe	Tyr	Glu	Trp	Met	Pro	Asp	Ser	Asn	Trp	
305					310					315					320	
Leu	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Asp	Phe	Asp	Tyr	Gln	Lys	Thr	Lys	Val	Ala	
				325					330					335		
Ala	Val	Asn	Asn	Lys	Gly	Ser	Phe	Pro	Met	Asp	Tyr	Ser	Thr	Trp	Thr	
			340					345						350		
Arg	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Asp	Leu	Asp	Glu	Ile	Tyr	Asn	Arg	Ser	Met	
		355					360					365				
Asp	Thr	Arg	Phe	Lys	Arg	Phe	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Ser	His	Pro	Leu	
	370					375					380					
Gln	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	His	Arg	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Val	Ser	
385					390					395					400	
Arg	Arg	Asp	Phe	Glu	Asn	Leu	Asn	Arg	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Gly	
			405						410					415		
Arg	Val	Val	Arg	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Gln	His	Pro	Val	Lys	Thr	Thr	
			420					425					430			
Asn	Tyr	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Gln	Ile	Gln	Trp	Asn	Asp	Val	Phe	
		435					440					445				
Ser	Ser	Arg	Ala	Gly	Ile	Arg	Tyr	Asp	His	Thr	Lys	Met	Thr	Pro	Gln	
	450					455					460					
Glu	Leu	Asn	Ala	Glu	Cys	His	Ala	Cys	Asp	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Ala	
465					470					475					480	
Asn	Thr	Tyr	Lys	Gly	Trp	Ser	Gly	Phe	Val	Gly	Leu	Ala	Ala	Gln	Leu	
			485						490					495		
Asn	Gln	Ala	Trp	Arg	Val	Gly	Tyr	Asp	Ile	Thr	Ser	Gly	Tyr	Arg	Val	
		500						505					510			
Pro	Asn	Ala	Ser	Glu	Val	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Asn	His	Gly	Ser	Gly	Asn	
		515					520					525				
Trp	Leu	Pro	Asn	Pro	Asn	Leu	Lys	Ala	Glu	Arg	Ser	Thr	Thr	His	Thr	
	530					535					540					

ES 2 759 484 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
 785 790

<210> 8
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

5

<400> 8

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

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

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

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

ES 2 759 484 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Tyr Pro Val Glu Gly Ala Gly Ser Gly Ala Asn Ile Arg Gly
225 230 235 240

Ser Ala Arg Gly Ile Pro Asp Pro Ser Gln His Lys Tyr Asn His His
245 250 255

Ala Leu Gly Lys Ile Ala Tyr Gln Ile Asn Asp Asn His Arg Ile Gly
260 265 270

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

Tyr Asn Leu Leu Ala Ser Tyr Trp Arg Glu Ala Asp Asp Val Asn Arg
290 295 300

Arg Arg Asn Thr Asn Leu Phe Tyr Glu Trp Thr Pro Glu Ser Asp Arg
305 310 315 320

Leu Ser Met Val Lys Ala Asp Val Asp Tyr Gln Lys Thr Lys Val Ser
325 330 335

Ala Val Asn Tyr Lys Gly Ser Phe Pro Ile Glu Asp Ser Ser Thr Leu
340 345 350

Thr Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Asp Leu Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Ser
355 360 365

Met Asp Thr Arg Phe Lys Arg Ile Thr Leu Arg Leu Asp Ser His Pro
370 375 380

Leu Gln Leu Gly Gly Gly Arg His Arg Leu Ser Phe Lys Thr Phe Ala
385 390 395 400

Ser Arg Arg Asp Phe Glu Asn Leu Asn Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Ser

ES 2 759 484 T3

				405						410						415
Gly	Arg	Val	Val	Arg	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Gln	His	Pro	Val	Lys	Thr	
			420					425					430			
Thr	Asn	Tyr	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Gln	Ile	Gln	Trp	Asn	Asp	Val	
		435					440					445				
Phe	Ser	Ser	Arg	Ala	Gly	Ile	Arg	Tyr	Asp	His	Thr	Lys	Met	Thr	Pro	
	450					455					460					
Gln	Glu	Leu	Asn	Ala	Glu	Cys	His	Ala	Cys	Asp	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	
465					470					475					480	
Ala	Asn	Thr	Tyr	Lys	Gly	Trp	Ser	Gly	Phe	Val	Gly	Leu	Ala	Ala	Gln	
				485					490					495		
Leu	Asn	Gln	Ala	Trp	Arg	Val	Gly	Tyr	Asp	Ile	Thr	Ser	Gly	Tyr	Arg	
			500					505					510			
Val	Pro	Asn	Ala	Ser	Glu	Val	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Asn	His	Gly	Ser	Gly	
		515					520					525				
Asn	Trp	Leu	Pro	Asn	Pro	Asn	Leu	Lys	Ala	Glu	Arg	Thr	Thr	Thr	His	
	530					535					540					
Thr	Leu	Ser	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Glu	Lys	Gly	Thr	Leu	Asp	Ala	Asn	
545					550					555					560	
Leu	Tyr	Gln	Ser	Asn	Tyr	Arg	Asn	Phe	Leu	Ser	Glu	Glu	Gln	Lys	Leu	
				565					570					575		
Thr	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Ser	Cys	Thr	Gln	Met	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	
			580					585					590			
Met	Cys	Ser	Asn	Pro	Tyr	Ser	Glu	Lys	Leu	Glu	Trp	Gln	Met	Gln	Asn	
		595					600					605				
Ile	Asp	Lys	Ala	Arg	Ile	Arg	Gly	Ile	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Leu	Asn	
	610					615					620					
Val	Asp	Lys	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Glu	Gly	Trp	Lys	Leu	Phe	Gly	
625					630					635					640	
Ser	Leu	Gly	Tyr	Ala	Lys	Ser	Lys	Leu	Ser	Gly	Asp	Asn	Ser	Leu	Leu	
				645					650					655		
Ser	Thr	Gln	Pro	Leu	Lys	Val	Ile	Ala	Gly	Ile	Asp	Tyr	Glu	Ser	Pro	
			660					665					670			
Ser	Glu	Lys	Trp	Gly	Val	Phe	Ser	Arg	Leu	Thr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Lys	
	675						680					685				
Lys	Val	Lys	Asp	Ala	Gln	Tyr	Thr	Val	Tyr	Glu	Asn	Lys	Gly	Trp	Gly	
	690					695					700					
Thr	Pro	Leu	Gln	Lys	Lys	Val	Lys	Asp	Tyr	Pro	Trp	Leu	Asn	Lys	Ser	
705					710					715					720	
Ala	Tyr	Val	Phe	Asp	Met	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Lys	Pro	Val	Lys	Asn	Leu	
				725					730					735		
Thr	Leu	Arg	Ala	Gly	Val	Tyr	Asn	Val	Phe	Asn	Arg	Lys	Tyr	Thr	Thr	
			740					745					750			

ES 2 759 484 T3

Trp Asp Ser Leu Arg Gly Leu Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Asn Ser Val
 755 760 765
 Asp Arg Asp Gly Lys Gly Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Pro Ser Arg Asn
 770 775 780
 Tyr Ala Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
 785 790

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

5

<400> 9

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

ES 2 759 484 T3

Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys
 275 280 285

Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg
 290 295 300

Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp
 305 310 315 320

Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly
 325 330 335

Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala
 340 345 350

Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro
 355 360 365

Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val
 370 375 380

Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg
 385 390 395 400

Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile
 405 410 415

Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala
 420 425 430

Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly
 435 440 445

Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly
 450 455 460

Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val
 465 470 475 480

Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 485

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

5

<400> 10

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn Leu Thr

ES 2 759 484 T3

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

<210> 12
 <211> 591
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 12

5

ES 2 759 484 T3

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

ES 2 759 484 T3

Val His Leu Asn Gly Ile Gly Ser Thr Leu Thr Asp Thr Leu Leu Asn
180 185 190

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

Lys Lys Arg Ala Ala Ser Val Lys Asp Val Leu Asn Ala Gly Trp Asn
210 215 220

Ile Lys Gly Val Lys Pro Gly Thr Thr Ala Ser Asp Asn Val Asp Phe
225 230 235 240

Val Arg Thr Tyr Asp Thr Val Glu Phe Leu Ser Ala Asp Thr Lys Thr
245 250 255

Thr Thr Val Asn Val Glu Ser Lys Asp Asn Gly Lys Lys Thr Glu Val
260 265 270

Lys Ile Gly Ala Lys Thr Ser Val Ile Lys Glu Lys Asp Gly Lys Leu
275 280 285

Val Thr Gly Lys Asp Lys Gly Glu Asn Gly Ser Ser Thr Asp Glu Gly
290 295 300

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

Gly Trp Arg Met Lys Thr Thr Thr Ala Asn Gly Gln Thr Gly Gln Ala
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Asp Gly Asn Ala Arg Ala Gly Ile Ala Gln Ala Ile Ala Thr Ala

ES 2 759 484 T3

515 520 525
 Gly Leu Val Gln Ala Tyr Leu Pro Gly Lys Ser Met Met Ala Ile Gly
 530 535 540
 Gly Gly Thr Tyr Arg Gly Glu Ala Gly Tyr Ala Ile Gly Tyr Ser Ser
 545 550 555 560
 Ile Ser Asp Gly Gly Asn Trp Ile Ile Lys Gly Thr Ala Ser Gly Asn
 565 570 575
 Ser Arg Gly His Phe Gly Ala Ser Ala Ser Val Gly Tyr Gln Trp
 580 585 590

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

5

<400> 13

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

ES 2 759 484 T3

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

Phe Leu Pro Thr Gly Gly Ser Phe Gly Asp Ser Gly Ser Pro Met Phe
 260 265 270

Ile Tyr Asp Ala Gln Lys Gln Lys Trp Leu Ile Asn Gly Val Leu Gln
 275 280 285

Thr Gly Asn Pro Tyr Ile Gly Lys Ser Asn Gly Phe Gln Leu Val Arg
 290 295 300

Lys Asp Trp Phe Tyr Asp Glu Ile Phe Ala Gly Asp Thr His Ser Val
 305 310 315 320

Phe Tyr Glu Pro Arg Gln Asn Gly Lys Tyr Ser Phe Asn Asp Asp Asn
 325 330 335

Asn Gly Thr Gly Lys Ile Asn Ala Lys His Glu His Asn Ser Leu Pro
 340 345 350

Asn Arg Leu Lys Thr Arg Thr Val Gln Leu Phe Asn Val Ser Leu Ser
 355 360 365

Glu Thr Ala Arg Glu Pro Val Tyr His Ala Ala Gly Gly Val Asn Ser
 370 375 380

Tyr Arg Pro Arg Leu Asn Asn Gly Glu Asn Ile Ser Phe Ile Asp Glu
 385 390 395 400

Gly Lys Gly Glu Leu Ile Leu Thr Ser Asn Ile Asn Gln Gly Ala Gly
 405 410 415

Gly Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Phe Thr Val Ser Pro Glu Asn Asn Glu
 420 425 430

Thr Trp Gln Gly Ala Gly Val His Ile Ser Glu Asp Ser Thr Val Thr
 435 440 445

Trp Lys Val Asn Gly Val Ala Asn Asp Arg Leu Ser Lys Ile Gly Lys
 450 455 460

Gly Thr Leu His Val Gln Ala Lys Gly Glu Asn Gln Gly Ser Ile Ser
 465 470 475 480

Val Gly Asp Gly Thr Val Ile Leu Asp Gln Gln Ala Asp Asp Lys Gly
 485 490 495

Lys Lys Gln Ala Phe Ser Glu Ile Gly Leu Val Ser Gly Arg Gly Thr
 500 505 510

Val Gln Leu Asn Ala Asp Asn Gln Phe Asn Pro Asp Lys Leu Tyr Phe
 515 520 525

Gly Phe Arg Gly Gly Arg Leu Asp Leu Asn Gly His Ser Leu Ser Phe
 530 535 540

His Arg Ile Gln Asn Thr Asp Glu Gly Ala Met Ile Val Asn His Asn
 545 550 555 560

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

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

ES 2 759 484 T3

Asn Gly Trp Phe Gly Glu Lys Asp Thr Thr Lys Thr Asn Gly Arg Leu
 595 600 605
 Asn Leu Val Tyr Gln Pro Ala Ala Glu Asp Arg Thr Leu Leu Leu Ser
 610 615 620
 Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Asn Ile Thr Gln Thr Asn Gly Lys Leu
 625 630 635 640
 Phe Phe Ser Gly Arg Pro Thr Pro His Ala Tyr Asn His Leu Asn Asp
 645 650 655
 His Trp Ser Gln Lys Glu Gly Ile Pro Arg Gly Glu Ile Val Trp Asp
 660 665 670
 Asn Asp Trp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Ala Glu Asn Phe Gln Ile Lys
 675 680 685
 Gly Gly Gln Ala Val Val Ser Arg Asn Val Ala Lys Val Lys Gly Asp
 690 695 700
 Trp His Leu Ser Asn His Ala Gln Ala Val Phe Gly Val Ala Pro His
 705 710 715 720
 Gln Ser His Thr Ile Cys Thr Arg Ser Asp Trp Thr Gly Leu Thr Asn
 725 730 735
 Cys Val Glu Lys Thr Ile Thr Asp Asp Lys Val Ile Ala Ser Leu Thr
 740 745 750
 Lys Thr Asp Ile Ser Gly Asn Val Asp Leu Ala Asp His Ala His Leu
 755 760 765
 Asn Leu Thr Gly Leu Ala Thr Leu Asn Gly Asn Leu Ser Ala Asn Gly
 770 775 780
 Asp Thr Arg Tyr Thr Val Ser His Asn Ala Thr Gln Asn Gly Asn Leu
 785 790 795 800
 Ser Leu Val Gly Asn Ala Gln Ala Thr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn
 805 810 815
 Gly Asn Thr Ser Ala Ser Gly Asn Ala Ser Phe Asn Leu Ser Asp His
 820 825 830
 Ala Val Gln Asn Gly Ser Leu Thr Leu Ser Gly Asn Ala Lys Ala Asn
 835 840 845
 Val Ser His Ser Ala Leu Asn Gly Asn Val Ser Leu Ala Asp Lys Ala
 850 855 860
 Val Phe His Phe Glu Ser Ser Arg Phe Thr Gly Gln Ile Ser Gly Gly
 865 870 875 880
 Lys Asp Thr Ala Leu His Leu Lys Asp Ser Glu Trp Thr Leu Pro Ser
 885 890 895
 Gly Thr Glu Leu Gly Asn Leu Asn Leu Asp Asn Ala Thr Ile Thr Leu
 900 905 910
 Asn Ser Ala Tyr Arg His Asp Ala Ala Gly Ala Gln Thr Gly Ser Ala
 915 920 925
 Thr Asp Ala Pro Arg Arg Arg Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Leu

ES 2 759 484 T3

930						935										940	
Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Thr	Ser	Val	Glu	Ser	Arg	Phe	Asn	Thr	Leu	Thr		
945					950					955							960
Val	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Gly	Gln	Gly	Thr	Phe	Arg	Phe	Met	Ser	Glu		
				965					970					975			
Leu	Phe	Gly	Tyr	Arg	Ser	Asp	Lys	Leu	Lys	Leu	Ala	Glu	Ser	Ser	Glu		
			980					985					990				
Gly	Thr	Tyr	Thr	Leu	Ala	Val	Asn	Asn	Thr	Gly	Asn	Glu	Pro	Ala	Ser		
		995					1000					1005					
Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Asp	Asn	Lys	Pro	Leu	Ser		
	1010						1015					1020					
Glu	Asn	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Gln	Asn	Glu	His	Val	Asp	Ala	Gly	Ala		
1025					1030					1035					1040		
Trp	Arg	Tyr	Gln	Leu	Ile	Arg	Lys	Asp	Gly	Glu	Phe	Arg	Leu	His	Asn		
				1045					1050					1055			
Pro	Val	Lys	Glu	Gln	Glu	Leu	Ser	Asp	Lys	Leu	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala		
			1060					1065					1070				
Lys	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Asp	Asn	Ala	Gln	Ser	Leu	Asp	Ala	Leu	Ile		
		1075					1080					1085					
Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Glu	Lys	Thr	Glu	Ser	Val	Ala	Glu	Pro		
		1090					1095					1100					
Ala	Arg	Gln	Ala	Gly	Gly	Glu	Asn	Val	Gly	Ile	Met	Gln	Ala	Glu	Glu		
1105					1110					1115					1120		
Glu	Lys	Lys	Arg	Val	Gln	Ala	Asp	Lys	Asp	Thr	Ala	Leu	Ala	Lys	Gln		
				1125					1130					1135			
Arg	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Thr	Thr	Ala	Phe	Pro	Arg	Ala	Arg		
			1140					1145					1150				
Arg	Ala	Arg	Arg	Asp	Leu	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Pro	Gln	Pro	Gln		
		1155					1160					1165					
Pro	Gln	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Arg	Tyr	Ala	Asn	Ser	Gly	Leu	Ser	Glu		
	1170						1175				1180						
Phe	Ser	Ala	Thr	Leu	Asn	Ser	Val	Phe	Ala	Val	Gln	Asp	Glu	Leu	Asp		
1185					1190					1195					1200		
Arg	Val	Phe	Ala	Glu	Asp	Arg	Arg	Asn	Ala	Val	Trp	Thr	Ser	Gly	Ile		
				1205					1210					1215			
Arg	Asp	Thr	Lys	His	Tyr	Arg	Ser	Gln	Asp	Phe	Arg	Ala	Tyr	Arg	Gln		
			1220					1225					1230				
Gln	Thr	Asp	Leu	Arg	Gln	Ile	Gly	Met	Gln	Lys	Asn	Leu	Gly	Ser	Gly		
		1235					1240					1245					
Arg	Val	Gly	Ile	Leu	Phe	Ser	His	Asn	Arg	Thr	Glu	Asn	Thr	Phe	Asp		
		1250					1255				1260						
Asp	Gly	Ile	Gly	Asn	Ser	Ala	Arg	Leu	Ala	His	Gly	Ala	Val	Phe	Gly		
1265					1270					1275					1280		

ES 2 759 484 T3

Gln Tyr Gly Ile Asp Arg Phe Tyr Ile Gly Ile Ser Ala Gly Ala Gly
 1285 1290 1295
 Phe Ser Ser Gly Ser Leu Ser Asp Gly Ile Gly Gly Lys Ile Arg Arg
 1300 1305 1310
 Arg Val Leu His Tyr Gly Ile Gln Ala Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Gly
 1315 1320 1325
 Gly Phe Gly Ile Glu Pro His Ile Gly Ala Thr Arg Tyr Phe Val Gln
 1330 1335 1340
 Lys Ala Asp Tyr Arg Tyr Glu Asn Val Asn Ile Ala Thr Pro Gly Leu
 1345 1350 1355 1360
 Ala Phe Asn Arg Tyr Arg Ala Gly Ile Lys Ala Asp Tyr Ser Phe Lys
 1365 1370 1375
 Pro Ala Gln His Ile Ser Ile Thr Pro Tyr Leu Ser Leu Ser Tyr Thr
 1380 1385 1390
 Asp Ala Ala Ser Gly Lys Val Arg Thr Arg Val Asn Thr Ala Val Leu
 1395 1400 1405
 Ala Gln Asp Phe Gly Lys Thr Arg Ser Ala Glu Trp Gly Val Asn Ala
 1410 1415 1420
 Glu Ile Lys Gly Phe Thr Leu Ser Leu His Ala Ala Ala Ala Lys Gly
 1425 1430 1435 1440
 Pro Gln Leu Glu Ala Gln His Ser Ala Gly Ile Lys Leu Gly Tyr Arg
 1445 1450 1455

Trp

<210> 14
 <211> 797
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 14

5

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

ES 2 759 484 T3

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

ES 2 759 484 T3

<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Enlazador
<400> 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

10 <210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador
<400> 16

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

15 <210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Marcador de poli-histidina
<400> 17

His His His His His His
1 5

25 <210> 18
<211> 2376
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis
<400> 18

ES 2 759 484 T3

atgaaacat	tacaaatgct	ccctatcgcc	gcgctggtcg	gcagtat	cggaatccg	60
gtcttggcag	cagatgaagc	tgcaactgaa	accacacccg	ttaaggcaga	gataaaagca	120
gtgcgcgta	aaggtcagcg	caatgcgcct	gcggctgtgg	aacgcgtcaa	ccttaaccgt	180
atcaaacaag	aaatgatacg	cgacaataaa	gacttgggtc	gctattccac	cgatgtcggc	240
ttgagcgaca	gcggccgcca	tcaaaaaggc	tttgctgttc	gcggcgtgga	aggcaaccgt	300
gtcggcgtga	gcatagacgg	tgtaaacctg	cctgattctg	aagaaaactc	gctgtacgcc	360
cgttatggca	acttcaacag	ctcgcgtttg	tctatcgacc	ccgaactcgt	cgcaacatc	420
gaaatcgtga	agggcgcgaga	ctctttcaat	accggcagtg	gtgcattggg	cgccggtgtg	480
aattaccaaa	cgctgcaagg	ccgtgatttg	ctggtggacg	acaggcaatt	cgccgtgatg	540
atgaaaaacg	gttacagcac	gcgtaaccgt	gaatggacaa	atactctcgg	tttcggtgtg	600
agtaacgacc	gcgtggatgc	tgctttgctg	tattcgcaac	gtcgcggtca	tgaaccgaa	660
agcgcgggaa	accgaggcta	tgctgtggaa	ggggaaggca	gtggcgcgaa	tatccgtggt	720
tcggcacgcg	gtatccctga	ttcgtccaaa	cacaaatacc	acagcttttt	gggtaagatt	780
gcttaccaaa	ttaacgataa	ccaccgcatc	ggcgcacgc	ttaacggcca	gcagggacat	840
aattacacgg	ttgaagagtc	ttataacctg	accgcttctt	cctggcgcga	agccgatgac	900
gtaaacagac	ggcgcgaatgc	caacctcttt	tacgaatgga	tgccctgattc	aaattggttg	960
tcgtctttga	aggcggactt	cgattatcag	aaaaccaaag	tggcggcggg	taacaacaaa	1020
ggctcgttcc	cgatggatta	ttccacctgg	acgcgcaact	ataatcagaa	ggatttggac	1080
gaaatataca	accgcagcat	ggacaccoga	ttcaaacggt	ttactttgcy	tttggacagc	1140
catccgttgc	aactcggggg	ggggcgacac	cgctgtcgt	ttaaaacttt	cgtcagccgc	1200
cgtgattttg	aaaacctaaa	ccgcgacgat	tattacttca	gcggccgtgt	tgttcgaacc	1260
accagcagta	tccagcatcc	ggtgaaaacc	accaactacg	gtttctcact	gtctgaccaa	1320
attcaatgga	acgacgtggt	cagtagccgc	gcaggtatcc	gttacgacca	cacaaaatg	1380
acgcctcagg	aattgaatgc	cgagtgtcat	gcttgtgaca	aaacaccacc	tgacgccaac	1440
acttataaag	gctggagcgg	ttttgtcggc	ttggcggcgc	aactgaatca	ggcttggcat	1500
gtcggttacg	acattacttc	cggtaccgc	gtccccaatg	cgtccgaagt	gtatttcacc	1560
tacaaccacg	gttcgggtaa	ttggctgcct	aatcccaacc	tgaaagccga	gcgcagcacc	1620
accacacacc	tgtctctgca	aggccgcagc	gaaaaaggca	tgctggatgc	caacctgtat	1680
caaagcaatt	accgcaat	cctgtctgaa	gagcagaagc	tgaccaccag	cggcactccc	1740
ggctgtactg	aggaaaatgc	ttactacggt	atatgcagcg	accctacaa	agaaaaactg	1800
gattggcaga	tgaaaaatat	cgacaaggcc	agaatccgcy	gtatcgagct	gacaggccgt	1860
ctgaatgtgg	acaaagtagc	gtcttttgtt	cctgaggggt	ggaaactggt	cggtctgctg	1920
ggttatgcga	aaagcaact	gtcgggcgac	aacagcctgc	tgtccacaca	gccgctgaaa	1980
gtgattgccg	gtatcgacta	tgaaagtccg	agcgaaaaat	ggggcgtatt	ctcccgcctg	2040
acctatctgg	gcgcgaaaaa	ggccaaagat	gcgcagtaca	ccgtttatga	aaacaagggc	2100
tggggtacgc	ctttgcagaa	aaaggtaaaa	gattaccctg	ggctgaacaa	gtcggcttat	2160
gtgtttgata	tgtacggctt	ctacaaaccg	gctaaaaacc	tgactttgcy	tgacggcgta	2220
tataatgtgt	tcaaccgcaa	atacaccact	tgggattccc	tgccgcggcct	gtatagctac	2280
agcaccacca	actcggtcga	ccgcgatggc	aaaggcttag	accgctaccg	cgcccaagc	2340
cgtaattacg	ccgtatcgct	ggaatggaag	ttttaa			2376

<210> 19

<211> 791

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 19

ES 2 759 484 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Leu Tyr Ser Gln Arg Arg Gly His Glu Thr Glu Ser Ala Gly Asn
210 215 220

Arg Gly Tyr Ala Val Glu Gly Glu Gly Ser Gly Ala Asn Ile Arg Gly
225 230 235 240

ES 2 759 484 T3

Ser Ala Arg Gly Ile Pro Asp Ser Ser Lys His Lys Tyr His Ser Phe
245 250 255

Leu Gly Lys Ile Ala Tyr Gln Ile Asn Asp Asn His Arg Ile Gly Ala
260 265 270

Ser Leu Asn Gly Gln Gln Gly His Asn Tyr Thr Val Glu Glu Ser Tyr
275 280 285

Asn Leu Thr Ala Ser Ser Trp Arg Glu Ala Asp Asp Val Asn Arg Arg
290 295 300

Arg Asn Ala Asn Leu Phe Tyr Glu Trp Met Pro Asp Ser Asn Trp Leu
305 310 315 320

Ser Ser Leu Lys Ala Asp Phe Asp Tyr Gln Lys Thr Lys Val Ala Ala
325 330 335

Val Asn Asn Lys Gly Ser Phe Pro Met Asp Tyr Ser Thr Trp Thr Arg
340 345 350

Asn Tyr Asn Gln Lys Asp Leu Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Ser Met Asp
355 360 365

Thr Arg Phe Lys Arg Phe Thr Leu Arg Leu Asp Ser His Pro Leu Gln
370 375 380

Leu Gly Gly Gly Arg His Arg Leu Ser Phe Lys Thr Phe Val Ser Arg
385 390 395 400

Arg Asp Phe Glu Asn Leu Asn Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Ser Gly Arg
405 410 415

Val Val Arg Thr Thr Ser Ser Ile Gln His Pro Val Lys Thr Thr Asn
420 425 430

Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Asp Gln Ile Gln Trp Asn Asp Val Phe Ser
435 440 445

Ser Arg Ala Gly Ile Arg Tyr Asp His Thr Lys Met Thr Pro Gln Glu
450 455 460

Leu Asn Ala Glu Cys His Ala Cys Asp Lys Thr Pro Pro Ala Ala Asn
465 470 475 480

Thr Tyr Lys Gly Trp Ser Gly Phe Val Gly Leu Ala Ala Gln Leu Asn
485 490 495

Gln Ala Trp His Val Gly Tyr Asp Ile Thr Ser Gly Tyr Arg Val Pro
500 505 510

Asn Ala Ser Glu Val Tyr Phe Thr Tyr Asn His Gly Ser Gly Asn Trp
515 520 525

Leu Pro Asn Pro Asn Leu Lys Ala Glu Arg Ser Thr Thr His Thr Leu
530 535 540

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

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

Ser Gly Thr Pro Gly Cys Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Tyr Gly Ile Cys

ES 2 759 484 T3

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

ES 2 759 484 T3

Pro Val Lys Thr Thr Asn Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Asp Gln Ile Gln
 260 265 270
 Trp Asn Asp Val Phe Ser Ser Arg Ala Gly Ile Arg Tyr Asp His Thr
 275 280 285
 Lys Met Thr Pro Gln Glu Leu Asn Ala Glu Cys His Ala Cys Asp Lys
 290 295 300
 Thr Pro Pro Ala Ala Asn Thr Tyr Lys Gly Trp Ser Gly Phe Val Gly
 305 310 315 320
 Leu Ala Ala Gln Leu Asn Gln Ala Trp His Val Gly Tyr Asp Ile Thr
 325 330 335
 Ser Gly Tyr Arg Val Pro Asn Ala Ser Glu Val Tyr Phe Thr Tyr Asn
 340 345 350
 His Gly Ser Gly Asn Trp Leu Pro Asn Pro Asn Leu Lys Ala Glu Arg
 355 360 365
 Ser Thr Thr His Thr Leu Ser Leu Gln Gly Arg Ser Glu Lys Gly Met
 370 375 380
 Leu Asp Ala Asn Leu Tyr Gln Ser Asn Tyr Arg Asn Phe Leu Ser Glu
 385 390 395 400
 Glu Gln Lys Leu Thr Thr Ser Gly Thr Pro Gly Cys Thr Glu Glu Asn
 405 410 415
 Ala Tyr Tyr Gly Ile Cys Ser Asp Pro Tyr Lys Glu Lys Leu Asp Trp
 420 425 430
 Gln Met Lys Asn Ile Asp Lys Ala Arg Ile Arg Gly Ile Glu Leu Thr
 435 440 445
 Gly Arg Leu Asn Val Asp Lys Val Ala Ser Phe Val Pro Glu Gly Trp
 450 455 460
 Lys Leu Phe Gly Ser Leu Gly Tyr Ala Lys Ser Lys Leu Ser Gly Asp
 465 470 475 480
 Asn Ser Leu Leu Ser Thr Gln Pro Leu Lys Val Ile Ala Gly Ile Asp
 485 490 495
 Tyr Glu Ser Pro Ser Glu Lys Trp Gly Val Phe Ser Arg Leu Thr Tyr
 500 505 510
 Leu Gly Ala Lys Lys Ala Lys Asp Ala Gln Tyr Thr Val Tyr Glu Asn
 515 520 525
 Lys Gly Trp Gly Thr Pro Leu Gln Lys Lys Val Lys Asp Tyr Pro Trp
 530 535 540
 Leu Asn Lys Ser Ala Tyr Val Phe Asp Met Tyr Gly Phe Tyr Lys Pro
 545 550 555 560
 Ala Lys Asn Leu Thr Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Val Phe Asn Arg
 565 570 575
 Lys Tyr Thr Thr Trp Asp Ser Leu Arg Gly Leu Tyr Ser Tyr Ser Thr
 580 585 590
 Thr Asn Ser Val Asp Arg Asp Gly Lys Gly Leu Asp Arg Tyr Arg Ala
 595 600 605
 Pro Ser Arg Asn Tyr Ala Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
 610 615 620

ES 2 759 484 T3

<210> 22
 <211> 768
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

5 <400> 22

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

ES 2 759 484 T3

Glu Trp Met Pro Asp Ser Asn Trp Leu Ser Ser Leu Lys Ala Asp Phe
 290 295 300
 Asp Tyr Gln Lys Thr Lys Val Ala Ala Val Asn Asn Lys Gly Ser Phe
 305 310 315 320
 Pro Met Asp Tyr Ser Thr Trp Thr Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Asp Leu
 325 330 335
 Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Ser Met Asp Thr Arg Phe Lys Arg Phe Thr
 340 345 350
 Leu Arg Leu Asp Ser His Pro Leu Gln Leu Gly Gly Arg His Arg
 355 360 365
 Leu Ser Phe Lys Thr Phe Val Ser Arg Arg Asp Phe Glu Asn Leu Asn
 370 375 380
 Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Ser Gly Arg Val Val Arg Thr Thr Ser Ser
 385 390 395 400
 Ile Gln His Pro Val Lys Thr Thr Asn Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Asp
 405 410 415
 Gln Ile Gln Trp Asn Asp Val Phe Ser Ser Arg Ala Gly Ile Arg Tyr
 420 425 430
 Asp His Thr Lys Met Thr Pro Gln Glu Leu Asn Ala Glu Cys His Ala
 435 440 445
 Cys Asp Lys Thr Pro Pro Ala Ala Asn Thr Tyr Lys Gly Trp Ser Gly
 450 455 460
 Phe Val Gly Leu Ala Ala Gln Leu Asn Gln Ala Trp His Val Gly Tyr
 465 470 475 480
 Asp Ile Thr Ser Gly Tyr Arg Val Pro Asn Ala Ser Glu Val Tyr Phe
 485 490 495
 Thr Tyr Asn His Gly Ser Gly Asn Trp Leu Pro Asn Pro Asn Leu Lys
 500 505 510
 Ala Glu Arg Ser Thr Thr His Thr Leu Ser Leu Gln Gly Arg Ser Glu
 515 520 525
 Lys Gly Met Leu Asp Ala Asn Leu Tyr Gln Ser Asn Tyr Arg Asn Phe
 530 535 540
 Leu Ser Glu Glu Gln Lys Leu Thr Thr Ser Gly Thr Pro Gly Cys Thr
 545 550 555 560
 Glu Glu Asn Ala Tyr Tyr Gly Ile Cys Ser Asp Pro Tyr Lys Glu Lys
 565 570 575
 Leu Asp Trp Gln Met Lys Asn Ile Asp Lys Ala Arg Ile Arg Gly Ile
 580 585 590
 Glu Leu Thr Gly Arg Leu Asn Val Asp Lys Val Ala Ser Phe Val Pro
 595 600 605
 Glu Gly Trp Lys Leu Phe Gly Ser Leu Gly Tyr Ala Lys Ser Lys Leu
 610 615 620
 Ser Gly Asp Asn Ser Leu Leu Ser Thr Gln Pro Leu Lys Val Ile Ala
 625 630 635 640

ES 2 759 484 T3

Gly Ile Asp Tyr Glu Ser Pro Ser Glu Lys Trp Gly Val Phe Ser Arg
645 650 655

Leu Thr Tyr Leu Gly Ala Lys Lys Ala Lys Asp Ala Gln Tyr Thr Val
660 665 670

Tyr Glu Asn Lys Gly Trp Gly Thr Pro Leu Gln Lys Lys Val Lys Asp
675 680 685

Tyr Pro Trp Leu Asn Lys Ser Ala Tyr Val Phe Asp Met Tyr Gly Phe
690 695 700

Tyr Lys Pro Ala Lys Asn Leu Thr Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Val
705 710 715 720

Phe Asn Arg Lys Tyr Thr Thr Trp Asp Ser Leu Arg Gly Leu Tyr Ser
725 730 735

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

Tyr Arg Ala Pro Ser Arg Asn Tyr Ala Val Ser Leu Glu Trp Lys Phe
755 760 765

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

5

<400> 23

Met Gln Gln Gln His Leu Phe Arg Phe Asn Ile Leu Cys Leu Ser Leu
1 5 10 15

Met Thr Ala Leu Pro Ala Tyr Ala Glu Asn Val Gln Ala Gly Gln Ala
20 25 30

Gln Glu Lys Gln Leu Asp Thr Ile Gln Val Lys Ala Lys Lys Gln Lys
35 40 45

Thr Arg Arg Asp Asn Glu Val Thr Gly Leu Gly Lys Leu Val Lys Ser
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 759 484 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Thr His Thr Lys Ser Arg Tyr Gly Leu Glu Tyr Val Tyr Thr Asn
405 410 415

Ala Asp Lys Asp Thr Trp Ala Asp Tyr Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Arg
420 425 430

Gln Gly Ile Gly Leu Asp Asn His Phe Gln Gln Thr His Cys Ser Ala
435 440 445

Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Cys Arg Pro Ser Ala Asp Lys Pro Phe Ser
450 455 460

Tyr Tyr Lys Ser Asp Arg Val Ile Tyr Gly Glu Ser His Arg Leu Leu
465 470 475 480

Gln Ala Ala Phe Lys Lys Ser Phe Asp Thr Ala Lys Ile Arg His Asn
485 490 495

Leu Ser Val Asn Leu Gly Phe Asp Arg Phe Gly Ser Asn Leu Arg His
500 505 510

Gln Asp Tyr Tyr Tyr Gln His Ala Asn Arg Ala Tyr Ser Ser Asn Thr

ES 2 759 484 T3

	515						520						525				
Pro	Pro	Gln	Asn	Asn	Gly	Lys	Lys	Ile	Ser	Pro	Asn	Gly	Ser	Glu	Thr		
	530					535					540						
Ser	Pro	Tyr	Trp	Val	Thr	Ile	Gly	Arg	Gly	Asn	Val	Val	Thr	Gly	Gln		
545					550					555					560		
Ile	Cys	Arg	Leu	Gly	Asn	Asn	Thr	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Pro	Arg	Ser		
				565					570						575		
Ile	Asn	Gly	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Val	Arg	Asp	Asn	Val	Arg	Leu		
			580					585					590				
Gly	Arg	Trp	Ala	Asp	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Arg	Ser		
		595					600					605					
Thr	His	Ser	Asp	Asp	Gly	Ser	Val	Ser	Thr	Gly	Thr	His	Arg	Thr	Leu		
	610					615					620						
Ser	Trp	Asn	Ala	Gly	Ile	Val	Leu	Lys	Pro	Thr	Asp	Trp	Leu	Asp	Leu		
625					630					635					640		
Thr	Tyr	Arg	Thr	Ser	Thr	Gly	Phe	Arg	Leu	Pro	Ser	Phe	Ala	Glu	Met		
				645					650					655			
Tyr	Gly	Trp	Arg	Ala	Gly	Val	Gln	Ser	Lys	Ala	Val	Lys	Ile	Asp	Pro		
			660					665					670				
Glu	Lys	Ser	Phe	Asn	Lys	Glu	Ala	Gly	Ile	Val	Phe	Lys	Gly	Asp	Phe		
		675					680					685					
Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Ser	Trp	Phe	Asn	Asn	Ala	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile		
	690					695					700						
Val	Arg	Gly	Tyr	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Asp	Gly	Lys	Glu	Glu	Ala	Lys		
705					710					715					720		
Gly	Asp	Pro	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ala	Gln	Ser	Ala	Arg	Ile	Thr	Gly	Ile		
				725					730					735			
Asn	Ile	Leu	Gly	Lys	Ile	Asp	Trp	Asn	Gly	Val	Trp	Asp	Lys	Leu	Pro		
			740					745					750				
Glu	Gly	Trp	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ala	Tyr	Asn	Arg	Val	Arg	Val	Arg	Asp		
		755					760						765				
Ile	Lys	Lys	Arg	Ala	Asp	Arg	Thr	Asp	Ile	Gln	Ser	His	Leu	Phe	Asp		
	770					775					780						
Ala	Ile	Gln	Pro	Ser	Arg	Tyr	Val	Val	Gly	Leu	Gly	Tyr	Asp	Gln	Pro		
785					790					795					800		
Glu	Gly	Lys	Trp	Gly	Val	Asn	Gly	Met	Leu	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ala	Lys		
				805					810					815			
Glu	Ile	Thr	Glu	Leu	Leu	Gly	Ser	Arg	Ala	Leu	Leu	Asn	Gly	Asn	Ser		
			820					825					830				
Arg	Asn	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala	Arg	Arg	Thr	Arg	Pro	Trp	Tyr	Ile	Val		
		835					840						845				
Asp	Val	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Val	Lys	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Arg	Ala		
	850					855					860						

ES 2 759 484 T3

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

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

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

Met Lys Phe
915

<210> 24

<211> 712

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 24

ES 2 759 484 T3

Met Asn Asn Pro Leu Val Asn Gln Ala Ala Met Val Leu Pro Val Phe
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ala Cys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Phe Asp Leu Asp Ser
20 25 30

Val Asp Thr Glu Ala Pro Arg Pro Ala Pro Lys Tyr Gln Asp Val Phe
35 40 45

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

Met Arg Leu Lys Arg Arg Asn Trp Tyr Pro Gln Ala Lys Glu Asp Glu
65 70 75 80

Val Lys Leu Asp Glu Ser Asp Trp Glu Ala Thr Gly Leu Pro Asp Glu
85 90 95

Pro Lys Glu Leu Pro Lys Arg Gln Lys Ser Val Ile Glu Lys Val Glu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 759 484 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Arg Ala Glu Phe Thr Val Asn Phe Ala Asp Lys Lys Ile Thr

ES 2 759 484 T3

595 600 605
 Gly Thr Leu Thr Ala Asp Asn Arg Gln Glu Ala Thr Phe Thr Ile Asp
 610 615 620
 Gly Asn Ile Lys Asp Asn Gly Phe Glu Gly Thr Ala Lys Thr Ala Glu
 625 630 635 640
 Ser Gly Phe Asp Leu Asp Gln Ser Asn Thr Thr Arg Thr Pro Lys Ala
 645 650 655
 Tyr Ile Thr Asp Ala Lys Val Gln Gly Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala
 660 665 670
 Glu Glu Leu Gly Gly Trp Phe Ala Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Lys
 675 680 685
 Asn Ala Thr Asn Ala Ser Gly Asn Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly
 690 695 700
 Ala Lys Arg Gln Gln Pro Val Arg
 705 710

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

5

<400> 25
 Met Asn Met Lys Thr Leu Leu Ala Leu Ala Val Ser Ala Val Cys Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Val Ala Gln Ala His Glu His Asn Thr Ile Pro Lys Gly Ala
 20 25 30
 Ser Ile Glu Val Lys Val Gln Gln Leu Asp Pro Val Asn Gly Asn Lys
 35 40 45
 Asp Val Gly Thr Val Thr Ile Thr Glu Ser Asn Tyr Gly Leu Val Phe
 50 55 60
 Thr Pro Asp Leu Gln Gly Leu Ser Glu Gly Leu His Gly Phe His Ile
 65 70 75 80
 His Glu Asn Pro Ser Cys Glu Pro Lys Glu Lys Glu Gly Lys Leu Thr
 85 90 95
 Ala Gly Leu Gly Ala Gly Gly His Trp Asp Pro Lys Gly Ala Lys Gln
 100 105 110
 His Gly Tyr Pro Trp Gln Asp Asp Ala His Leu Gly Asp Leu Pro Ala
 115 120 125
 Leu Thr Val Leu His Asp Gly Thr Ala Thr Asn Pro Val Leu Ala Pro
 130 135 140
 Arg Leu Lys His Leu Asp Asp Val Arg Gly His Ser Ile Met Ile His
 145 150 155 160
 Thr Gly Gly Asp Asn His Ser Asp His Pro Ala Pro Leu Gly Gly Gly
 165 170 175
 Gly Pro Arg Met Ala Cys Gly Val Ile Lys
 180 185

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un meningococo que expresa NadA y opcionalmente NHBA, en el que el meningococo es isogénico con una cepa parental, excepto por una modificación genética que hace que el meningococo exprese más NadA y opcionalmente más NHBA que la cepa parental, en el que el meningococo no expresa NadR y en el que la bacteria no expresa un MltA activo.
2. El meningococo de la reivindicación 1, que incluye (i) un gen bajo el control de un promotor que no controla ese gen en la cepa parental y/o (ii) una desactivación de un gen que se encuentra en la cepa parental.
3. El meningococo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la expresión de NHBA está controlada por un promotor inducible o constitutivo y en el que el promotor incluye opcionalmente un CREM.
- 10 4. El meningococo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la bacteria también expresa más fHbp que la cepa parental.
5. El meningococo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que:
 - (i) la bacteria tiene una inactivación de LpxL1;
 - (ii) la bacteria no expresa PorA; y/o
 - 15 (iii) la bacteria no expresa FrpB.
6. El meningococo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el serogrupo B.
7. El meningococo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en inmunotipo L3.
8. Un procedimiento de preparación de una cepa meningocócica adecuada para la preparación de VME, que comprende las etapas de (i) elegir una cepa de partida que exprese NadA y opcionalmente NHBA; y (ii) modificar la cepa de partida para aumentar la cantidad de NadA y opcionalmente NHBA que expresa, en el que el meningococo no expresa NadR y no expresa un MltA activo.
- 20 9. El procedimiento de la reivindicación 8, que incluye una etapa de (iii) cultivar las bacterias modificadas obtenidas en la etapa (ii) para proporcionar un cultivo bacteriano.
10. Un procedimiento de preparación de una vesícula meningocócica, que comprende una etapa de tratamiento de un cultivo bacteriano obtenido mediante el procedimiento de la reivindicación 9, de modo que su membrana externa forme vesículas.
- 25 11. Vesículas de membrana externa preparadas a partir del meningococo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o preparadas por el procedimiento de la reivindicación 10.
12. Una composición farmacéutica inmunogénica que comprende las vesículas de la reivindicación 11.
- 30 13. La composición de la reivindicación 12, incluyendo uno o más sacáridos capsulares de meningococos y/o incluyendo un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.
14. La composición de la reivindicación 12 o la reivindicación 13 para su uso en la elevación de una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar la composición al mamífero.

FIG. 1

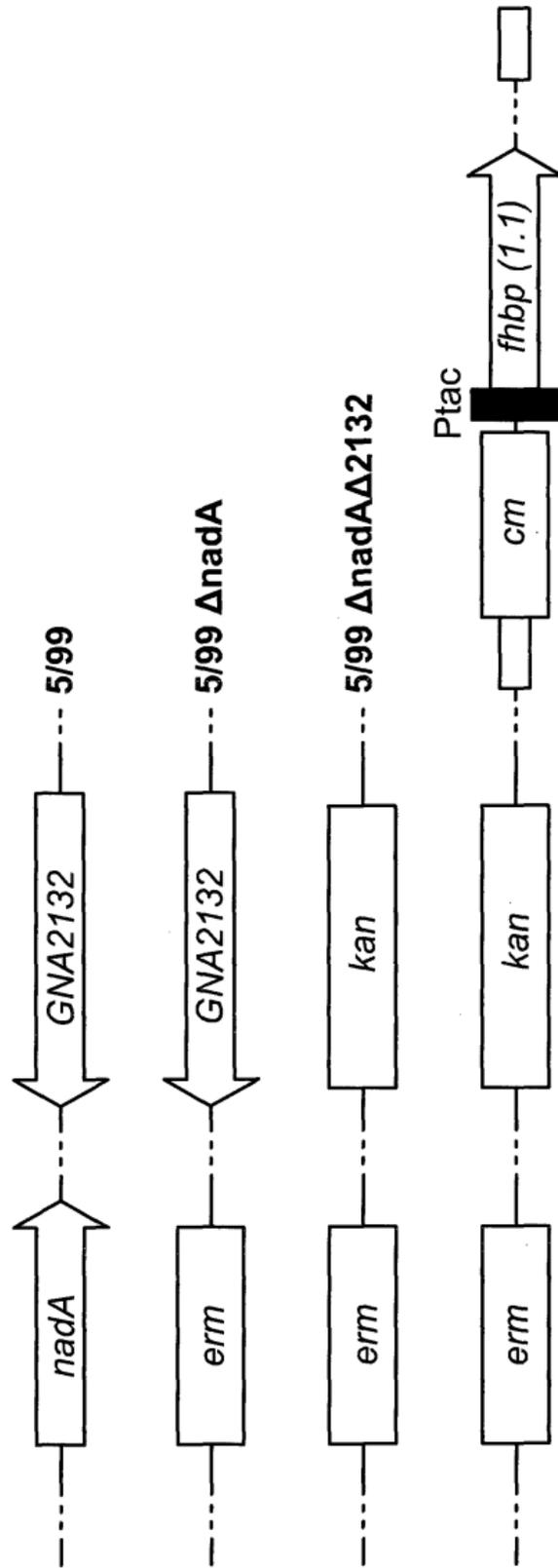
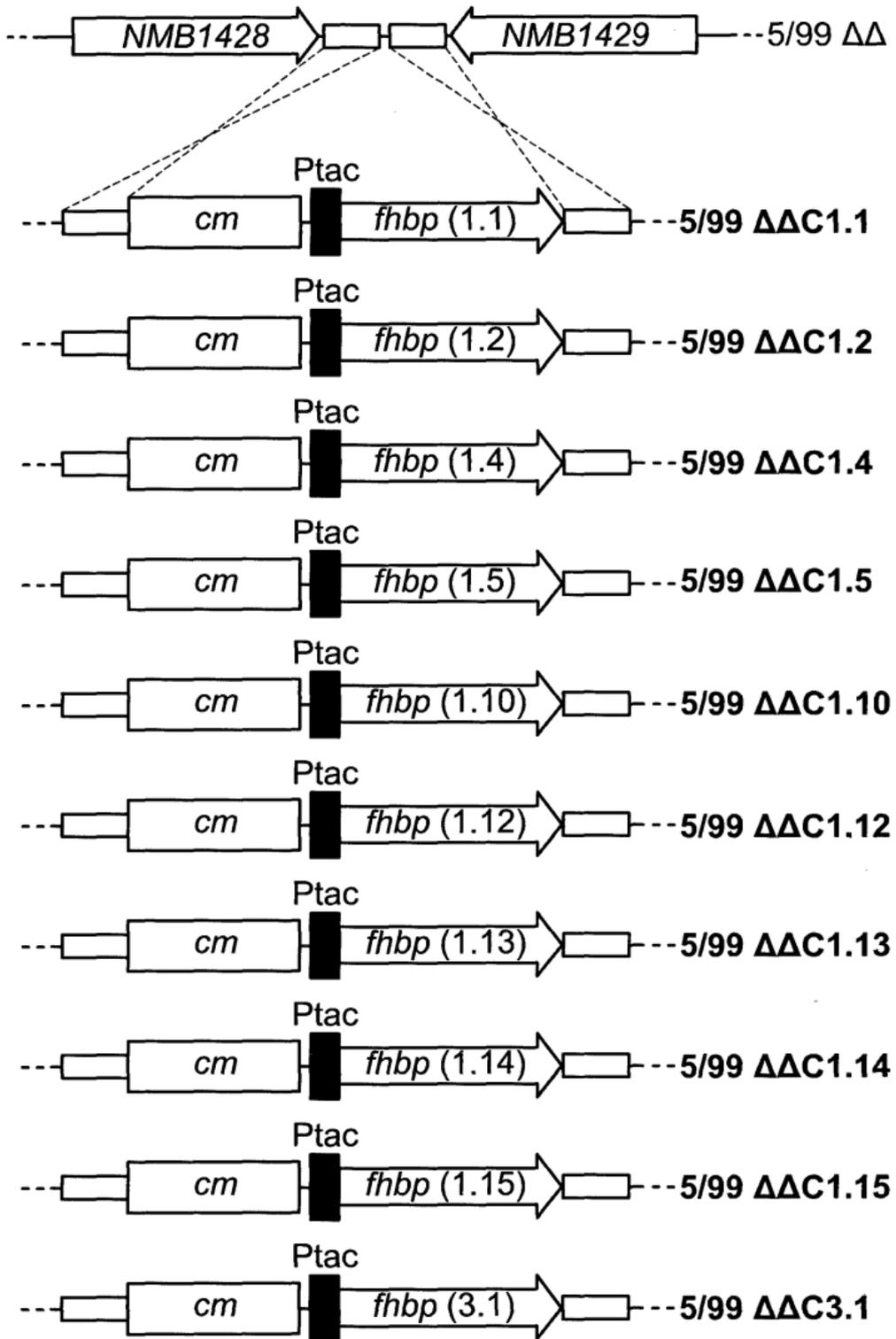
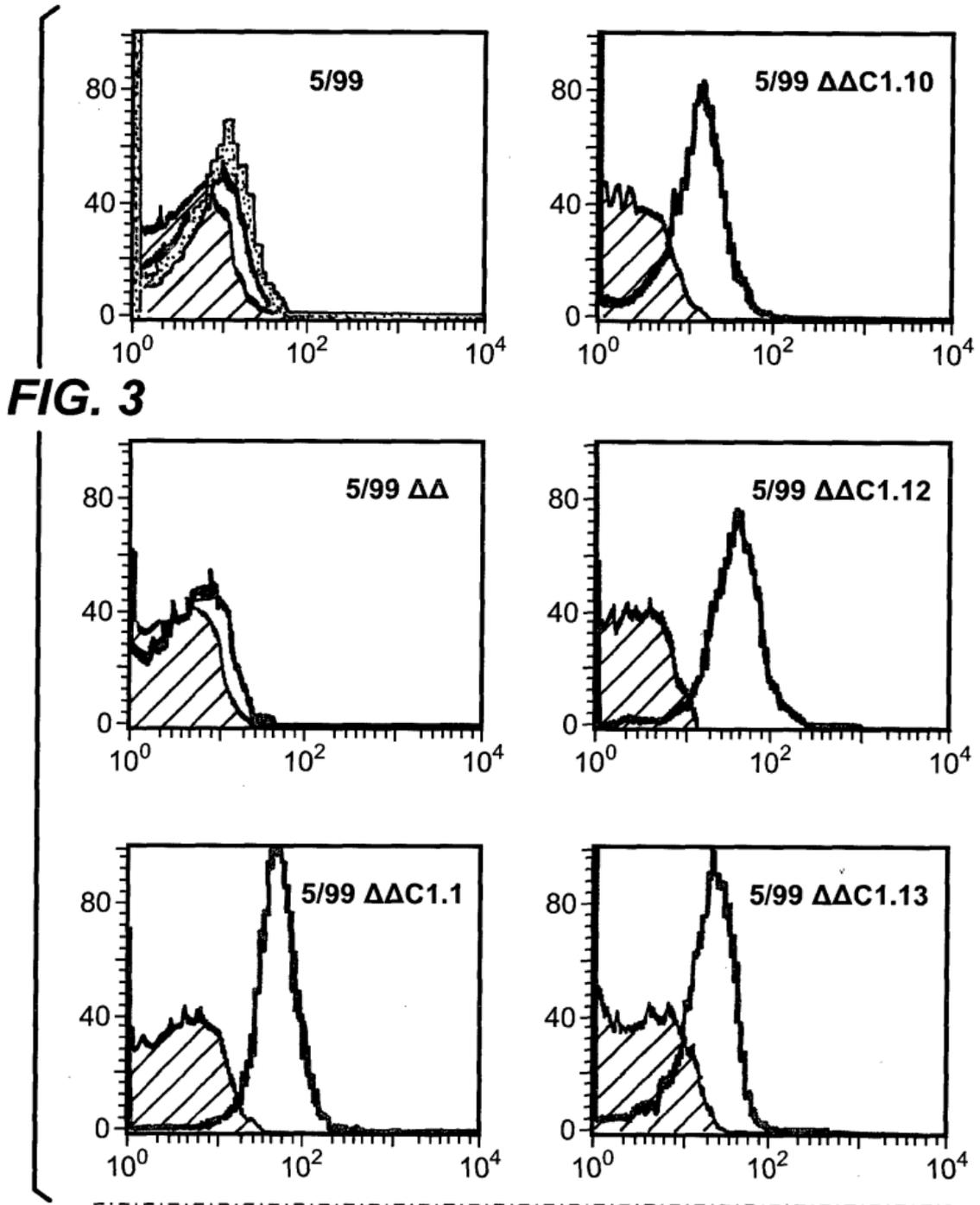


FIG. 2





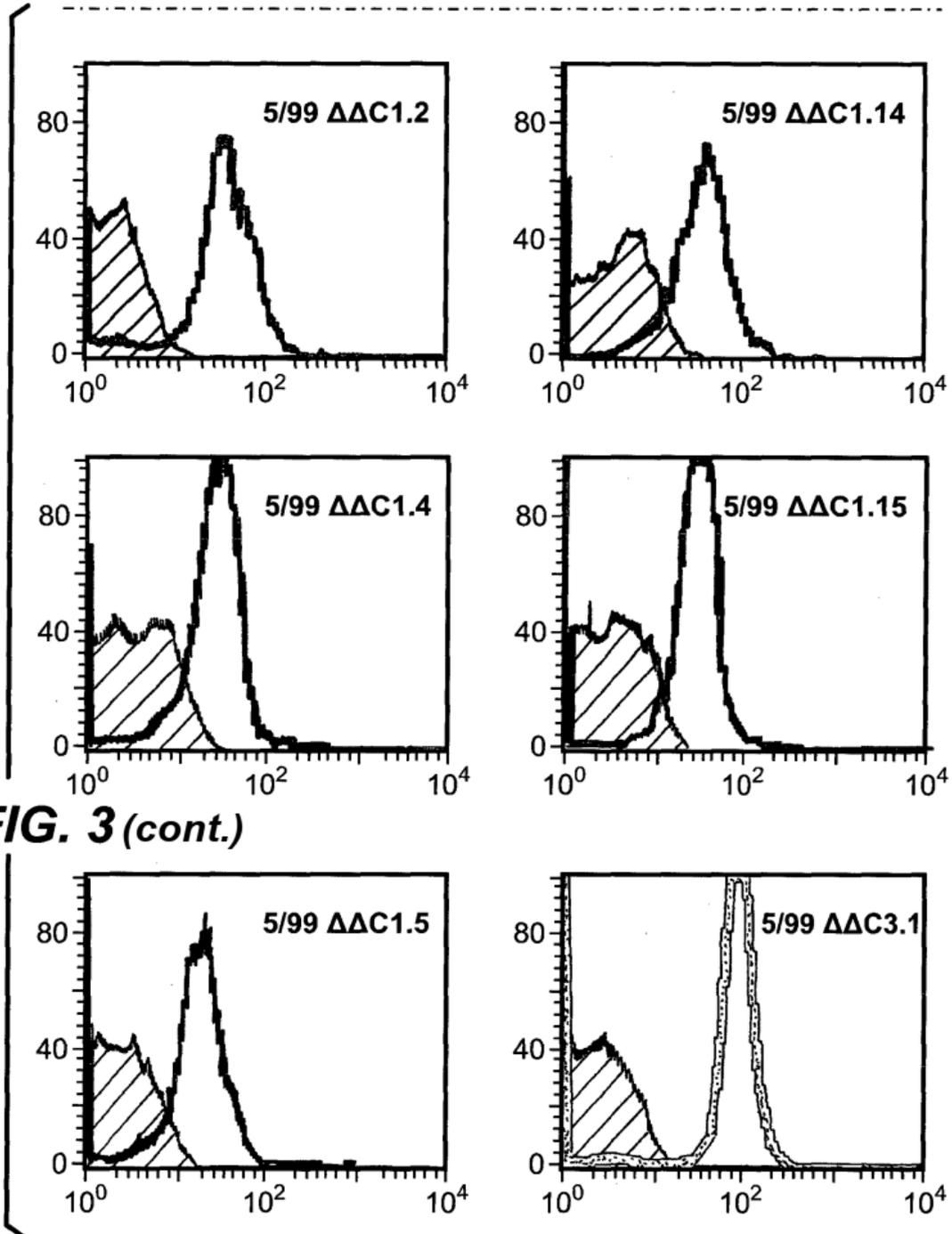


FIG. 3 (cont.)

FIG. 4A

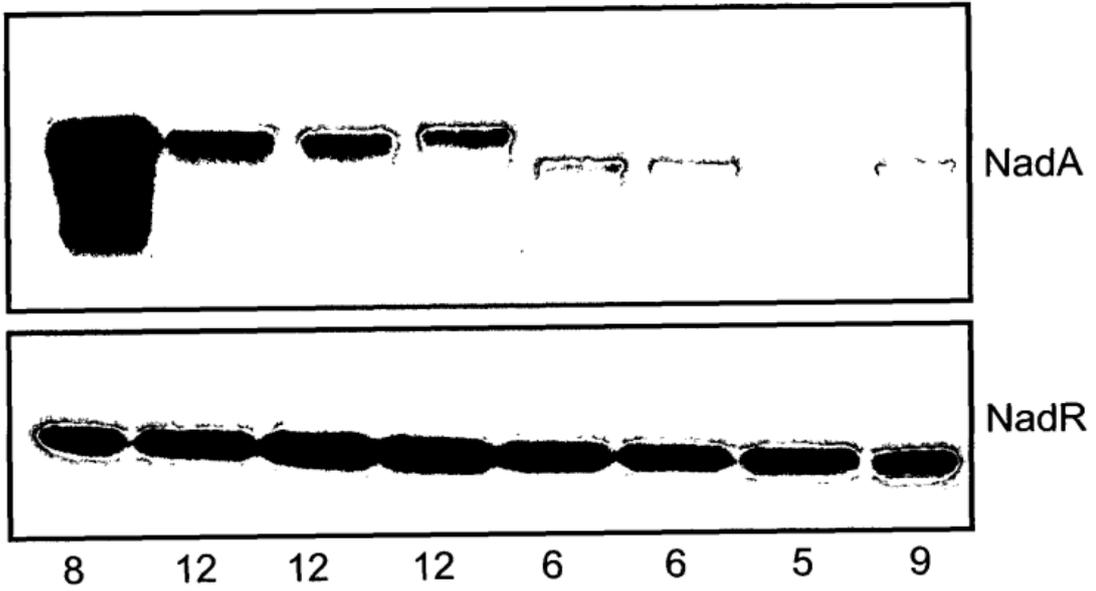


FIG. 4B

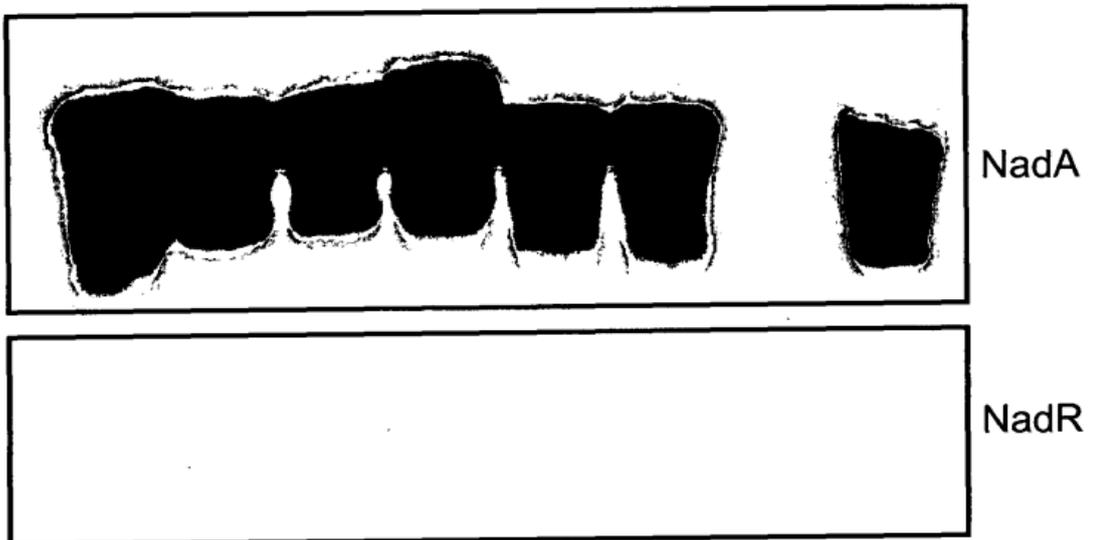


FIG. 4C

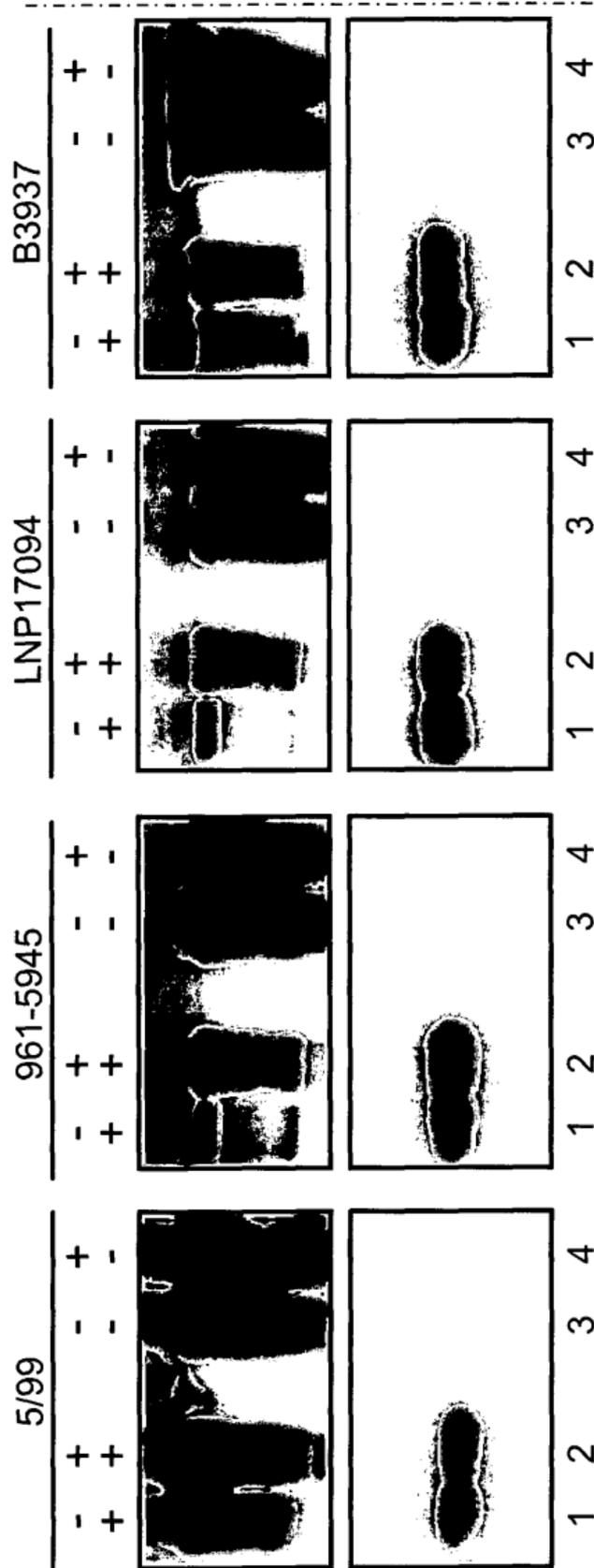


FIG. 4C(cont.)

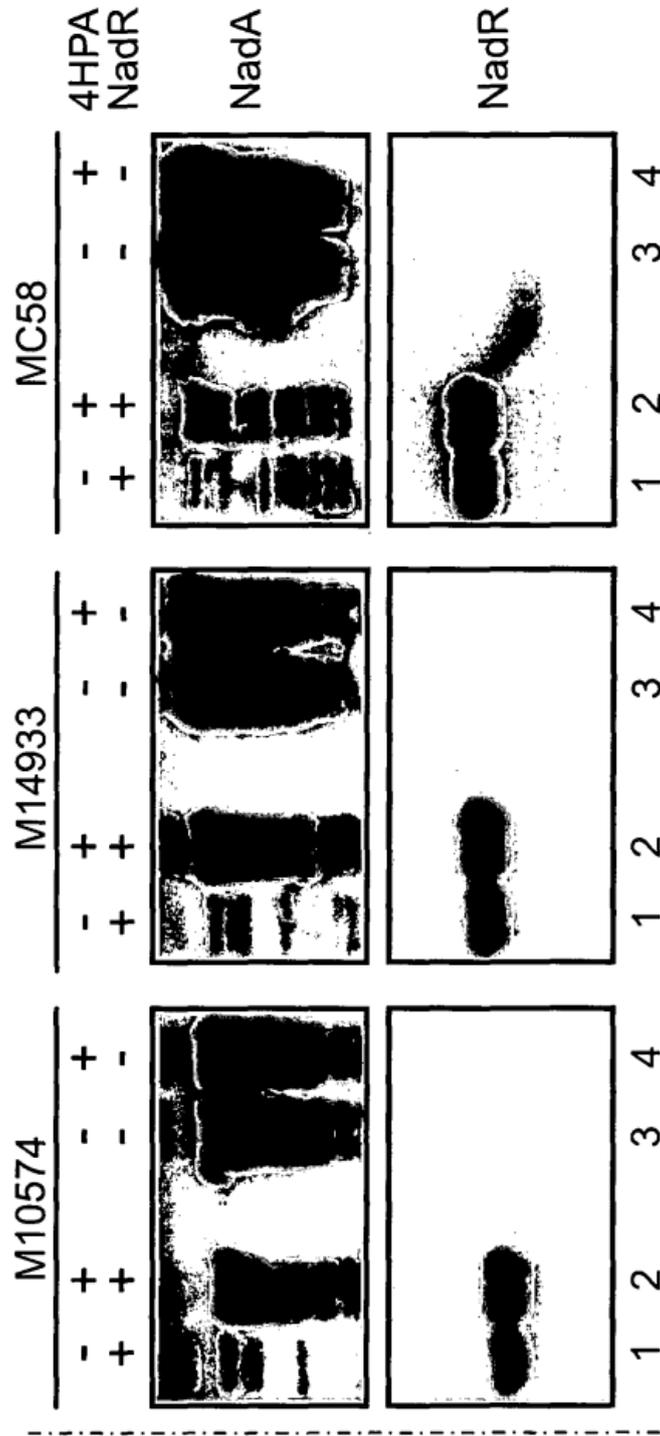


FIG. 5A

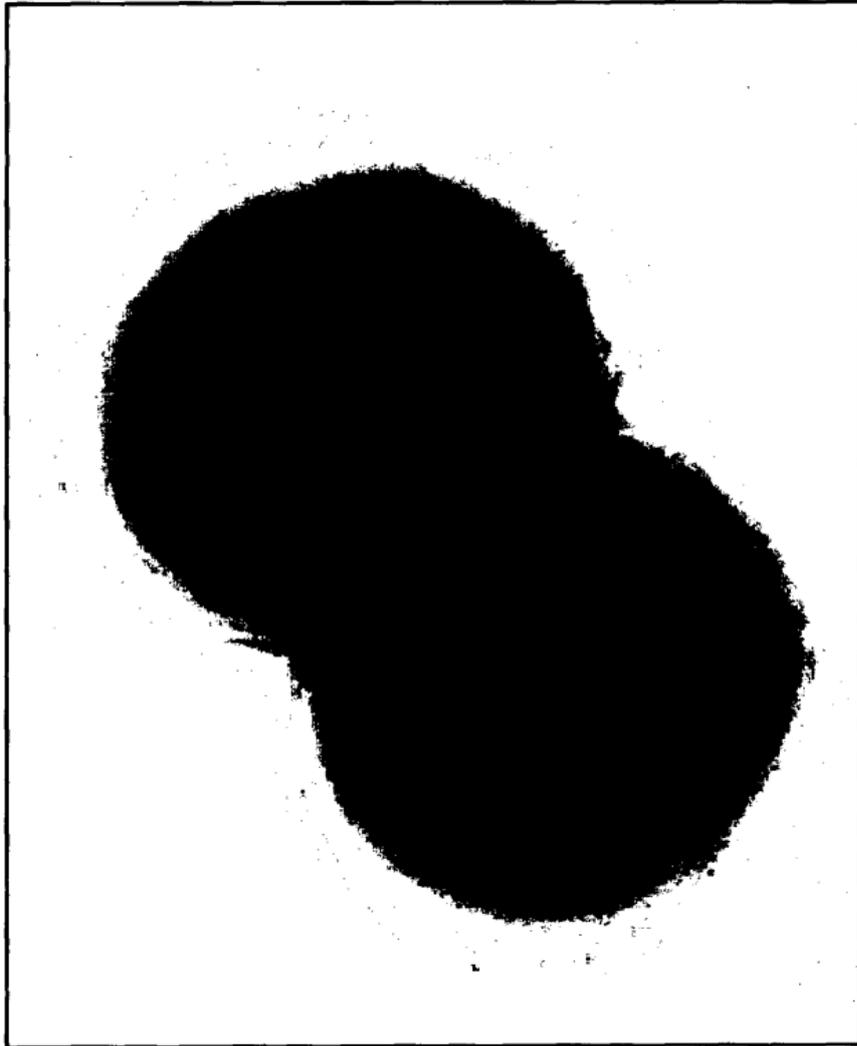


FIG. 5B

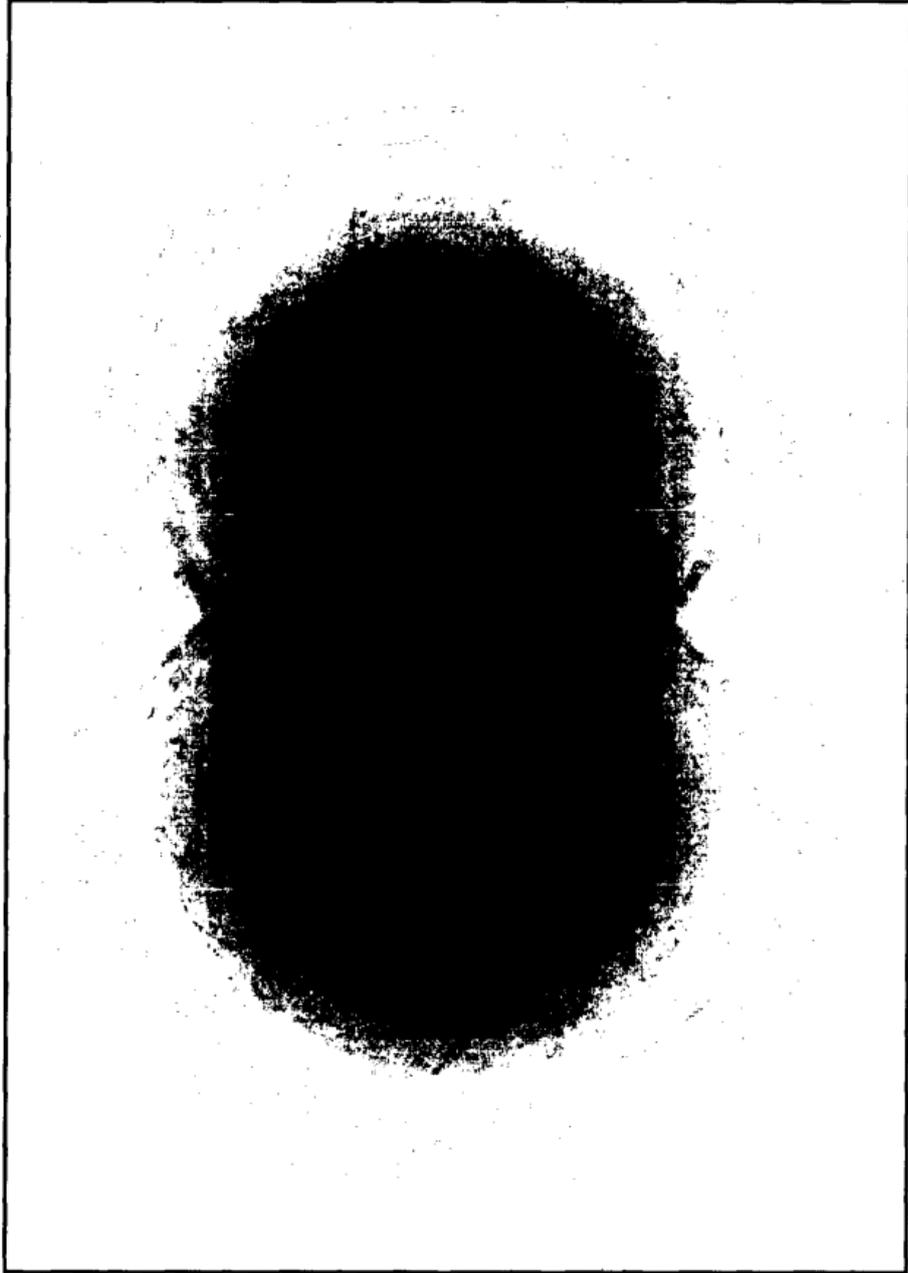


FIG. 5C

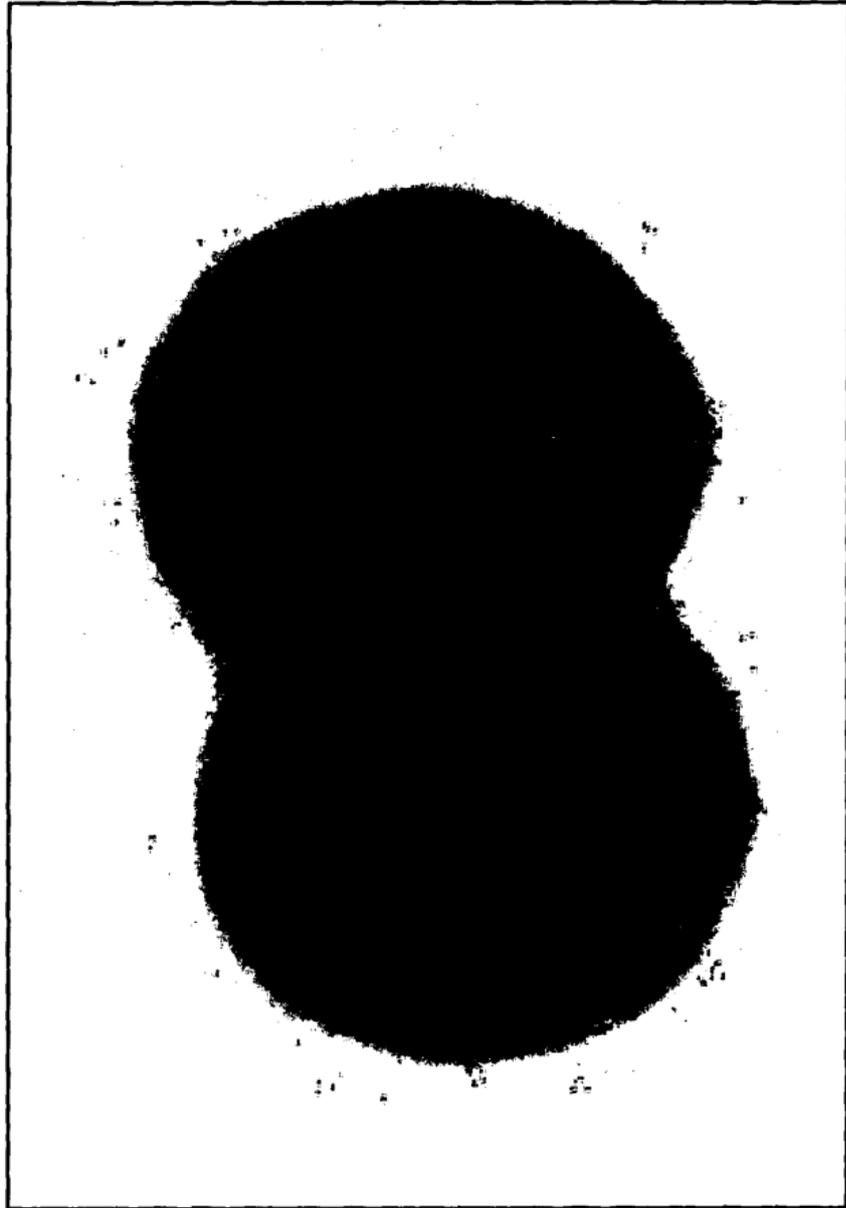


FIG. 6

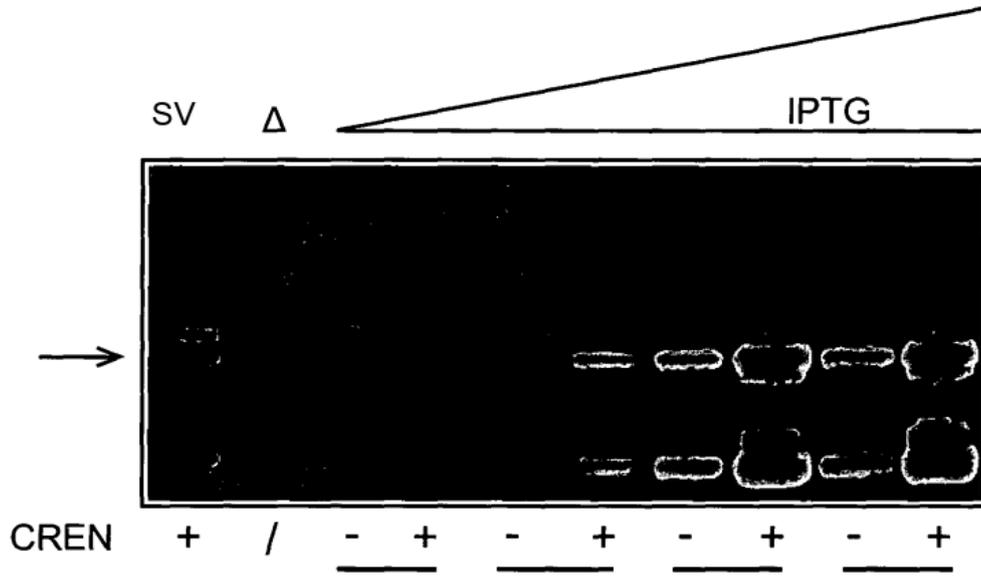


FIG. 7

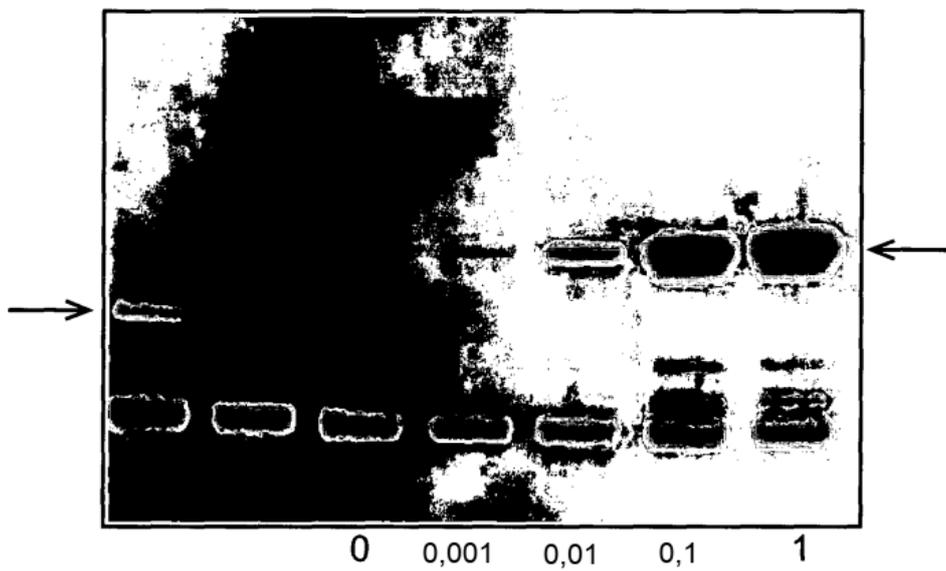


FIG. 8

