

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 747**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2003 PCT/IB2003/006320**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2004 WO04048404**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2003 E 03780528 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.11.2017 EP 1562983**

54 Título: **Variantes múltiples de protenia NMB 1870 de meningococo**

30 Prioridad:

**22.11.2002 GB 0227346**

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

**02.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COMANDUCCI, MAURIZIO, CHIRON SRL y  
PIZZA, MARIAGRAZIA, CHIRON SRL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Variantes multiples de protenia NMB 1870 de meningococo****Descripción****5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuentra en el campo de la vacunación y, en particular, en la vacunación contra enfermedades causada por bacterias patógenas del género *Neisseria* tales que *N.meningitidis* (meningococos).

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

*Neisseria meningitidis* es una bacteria encapsulada gram negativa que coloniza el tracto respiratorio superior de, aproximadamente, el 10 % de la población. Aproximadamente, en una de cada 10.000 personas colonizadas (o una de 100.000) la bacteria se introduce en el torrente sanguíneo, donde se multiplica y causa sepsis. Desde el torrente sanguíneo, la bacteria puede atravesarla barrera hematocefálica y causar meningitis. Ambas enfermedades son devastadoras y pueden matar del 5 % al 15 % de los niños y jóvenes adultos en horas, a pesar de que existen antibióticos efectivos. Más del 25 % de los que sobreviven a la enfermedad sufren secuelas permanentes.

La prevención de la enfermedad se ha conseguido parcialmente gracias a la vacunación. La inmunización se hizo posible en 1969 cuando se descubrió que la protección de la enfermedad está relacionada con la presencia de anticuerpos del suero capaces de inducir la destrucción bacteriana mediada por complemento y que los polisacáridos capsulares conjugados eran capaces de inducir estos anticuerpos. Aunque existen vacunas de polisacáridos y las vacunas conjugadas contra los serotipos A, C, W135 e Y, este enfoque no puede aplicarse al serotipo B ya que el polisacárido capsular es un polímero de ácido polisialílico, un autoantígeno en humanos. Para desarrollar una vacuna contra el serotipo B se han utilizado las proteínas expuestas en la superficie de vesículas de la membrana externa. Estas vacunas provocaron respuestas de anticuerpos bactericidas en el suero y protegían de la enfermedad, pero no inducían protección cruzada de cepas [1].

La secuencia genómica completa del serotipo B *N. meningitidis* ya se ha publicado [2] y ha sido sujeto de análisis para identificar antígenos de la vacuna [3]. También se conoce la secuencia genómica completa del serotipo A *N. meningitidis* [4], y la secuencia genómica completa de la cepa FA1090 de *Neisseria gonorrhoeae* se encuentra disponible [5]. Las referencias de la 6 a la 9 describen proteínas de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*, y se describen enfoques de la expresión a estas proteínas en las referencias 10 a 12.

Es objeto de la presente invención proporcionar y mejorar composiciones que otorguen inmunidad contra enfermedades y / o infecciones por meningococos, en particular para el serotipo B.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Una de las, aproximadamente, 2.200 proteínas descritas en la referencia 2 es "NMB1870". En un principio, la proteína se describió como proteína "741" de la cepa MC58 (SECs ID N° 2535 y 2536 de la referencia 8M SEC ID N° 1) y también se ha nombrado como "GNA1870" [referencia 3] o como "ORF2086" [13].

La referencia 13 describe diversas secuencias de NMB1870 y las divide en subfamilias "A" y "B". Estas subfamilias pueden combinarse. La referencia 13 no describe combinaciones adyuvantes con una sal de aluminio y no describe la unión de las subfamilias A y B como una proteína de fusión.

Se ha descubierto que NMB1870 es un antígeno extremadamente efectivo para provocar respuestas de anticuerpos frente al meningococo y que es expresado por todos los serotipos meningococo. Se ha encontrado NMB1870 en todas las cepas meningocócicas probadas hasta la fecha. Se han identificado cuarenta y dos secuencias meningocócicas diferentes de NMB1870, y se ha descubierto que esas secuencias se agrupan en tres variantes. Además, se ha descubierto que el suero producido contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo de variante, pero no es activo contra cepas que expresen una de las otras dos variantes, es decir, hay protección cruzada dentro de las variantes pero no entre variantes. Por lo tanto, para una mayor eficacia cruzada de las cepas, debería utilizarse más de una variante para inmunizar un paciente.

La invención presenta además una composición que comprende, al menos, los siguientes dos antígenos:

- (a) Una primera proteína compuesta de una secuencia aminoácida que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el  $a$  % respecto a la SEC ID N° 24; y
- (b) Una segunda proteína compuesta de una secuencia aminoácida que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el  $b$  % respecto a la SEC ID N° 33 y también incluyen una sal de aluminio adyuvante.

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. Los valores de  $a$  y  $b$  no están intrínsecamente relacionados unos con otros.

Las proteínas (a) y (b) están estrechamente relacionadas a sus secuencias "prototipo", pero no están tan estrechamente relacionadas la una con la otra.

5 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a, al menos, una cepa de *N. meningitidis* de cada grupo, al menos dos, de los siguientes tres grupos de cepas:

10 (a) MC58, gb185 (= M01 – 240185), m4030, m2197, m2937, iss1001, NZ394 / 98, 67/00, 93 / 114, b198, m1390, nge28, lnp17592, 00-241341, f6124, 205900, m198 / 172, bz133, gb149 (= M01 – 240149), nm008, nm092, 30 / 00, 39 / 99, 72 / 00, 95330, bz169, bz83, cu385, h44 / 76, m1590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44 / 89, 14847.

(b) 961 – 5945, 2996, 96217, 312294, 11327, a22, gb013 (= M01 – 240013), e32, m1090, m4287, 860800, 599, 95N477, 90 – 18311, c11, m986, m2671, 1000, m1096, m3279, bz232, dk353, m3697, ngh38, L93 / 4286.

15 (c) M1239, 16889, gb355 (= M01 – 240355), m3369, m3813, ngp165.

Por ejemplo, la mezcla puede obtener una respuesta bactericida efectiva frente a cada serotipo B de las cepas MC58, 961 – 5945 y M1239 de *N. meningitidis*.

20 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a, al menos, el 50 % de las cepas meningocócicas clínicamente relevantes del serotipo B (por ejemplo, al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más).

25 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas del serotipo B y cepas de, al menos, uno (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) de los serotipos A, C, W135 e Y.

La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas de *N. gonococcus* y / o *N. cinerea*.

30 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas de, al menos, dos de las tres ramas principales del dendrograma mostrado en la Figura 9 (es decir, el dendrograma obtenido por el análisis de las SECs ID 1 a 23 mediante el algoritmo de Kimura & Jukes – Cantor).

35 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas *N. meningitidis* en, al menos, 2 (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o 7) de las razas hipervirulentas ET – 37, ET – 5, el cúmulo A4, la raza 3 y los subgrupos I, III y IV – 1 [14, 15].

40 Las composiciones de la presente invención puede inducir adicionalmente respuestas anticuerpo bactericidas frente a una o más razas hiperinvasivas.

45 La mezcla puede preferiblemente obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a cepas de *N. meningitidis* en, al menos, 2 (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o 7= de los siguientes tipos de secuencia multilocus: ST1, ST4, ST5, ST8, ST11, ST32 y ST41 [16]. La mezcla puede también obtener una respuesta anticuerpo bactericida frente a las cepas ST44.

50 Las respuestas anticuerpo bactericidas se han medido convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [véase, por ejemplo, la nota final de la referencia 3]. La composición no necesita inducir anticuerpos bactericidas frente a todas y cada una de las cepas MenB en las razas especificadas o MLST; más bien, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas del serotipo B meningococos en una raza hipervirulenta en particular o un MLST, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas frente a, al menos, el 50 % (por ejemplo el 60 %, 70%, 80 %, 90 % o más) del grupo. En la forma preferente, los grupos de cepas incluirán cepas aisladas en, al menos, cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. Preferiblemente, el suero tiene un título bactericida de, al menos, 1024 (por ejemplo 2<sup>10</sup>, 2<sup>11</sup>, 2<sup>12</sup>, 2<sup>13</sup>, 2<sup>14</sup>, 2<sup>15</sup>, 2<sup>16</sup>, 2<sup>17</sup>, 2<sup>18</sup> o superior, preferiblemente de, al menos, 2<sup>14</sup>), es decir, el suero es capaz de matar al menos al 50 % de la bacteria de prueba de una cepa en particular cuando se diluye 1 / 1024, por ejemplo, como se describe en la nota final 14 de la referencia 3.

### **Lipoproteínas**

60 NMB1870 es una lipoproteína natural de *N. meningitidis*. También se ha descubierto lipídada cuando se expresa en *E. coli*.

65 En la forma preferente, la o las (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) proteínas NMB1870 incluidas en las composiciones de la invención son lipoproteínas.

En la forma preferente, la lipoproteína tiene un residuo de cisteína N – Terminal al que se une el lípido

covalentemente. Preparar la lipoproteína mediante expresión bacteriana requiere, por lo general, una señal peptídica N – Terminal apta para dirigir la lipidación mediante transferasa diacilgliceril, seguida del corte por una peptidasa señal específica de lipoproteínas (peptidasa señal II). Aunque la lipoproteína de la invención puede tener una cisteína N – Terminal (por ejemplo, las SECs ID 24 a 45), también será un producto de modificación post-translacional de una proteína naciente que tenga la metionina N – Terminal corriente (por ejemplo, las SECs ID 1 a 22).

La lipoproteína puede asociarse con una bicapa lipídica y solubilizarse con detergente.

## 10 **Secuencias**

Las proteínas NMB1870 útiles para la presente invención comprenden una secuencia aminoácida con identidad de secuencia de una o más de las SECs ID 1 a 23 y / o con fragmentos de una o más de las SECs ID 1 a 23.

15 Las proteínas NMB1870 útiles para la presente invención comprenden una secuencia aminoácida con identidad de secuencia de una o más de las SECs ID 1 a 252 de la referencia 13 y / o con un fragmento de una o más de las SECs ID 1 a 252 de la referencia 13. Las SECs ID 300 – 302 de la referencia 13 presentan secuencias consenso y las SECs ID 254 – 299 son fragmentos.

20 En la forma preferente, las secuencias aminoácidas con menos del 100 % de identidad respecto a las SECs ID Nº 1 a 23 son variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas, mutantes, etc de las mismas. En la forma preferente, la o las diferencias en las variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas o mutantes, en comparación a las SECs ID Nº 1 a 23, suponen la sustitución de un aminoácido conservativo, es decir, la sustitución de un aminoácido con otro que tiene una cadena lateral relacionada. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen, generalmente, en cuatro familias: (1) ácido, es decir, aspartato, glutamato; (2) básico, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polar, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar sin carga, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican, a veces, como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos simples de estas familias no tiene un efecto mayor en la actividad biológica.

30 En la forma preferente, el subconjunto de proteínas no incluye las secuencias aminoácidas TRSKP (SEC ID Nº 70) ni TRSKPV (SEC ID Nº 71) en 10 aminoácidos del extremo N – Terminal de la proteína. En la forma preferente, otro subconjunto de proteínas no incluye la secuencia aminoácida PSEPPFG (SEC ID Nº 72) en 10 aminoácidos del extremo N – Terminal de la proteína.

35 En la forma preferente, otro subconjunto de proteínas para su utilización con la presente invención incluye la secuencia aminoácida (GLY)<sub>n</sub>, donde n es 1, 2, 3, 4 o más, por ejemplo, SEC ID Nº 73.

40 Una característica de las proteínas preferidas de la invención es la habilidad para inducir anticuerpos bactericidas frente al meningococo tras su administración a un animal huésped.

45 Las proteínas se pueden preparar mediante diversos medios como, por ejemplo, la síntesis química (al menos en parte), la digestión de polipéptidos largos mediante proteasas, la traducción a partir de ARN, la purificación a partir de cultivos celulares (por ejemplo a partir de expresión recombinante o de cultivos de *N. meningitidis*), etc. La expresión heteróloga en un huésped de *E. coli* es la ruta de expresión preferida (por ejemplo, las cepas DH5α, BL21 (DE<sub>3</sub>), BLR, etc.).

Las proteínas de la invención pueden estar unidas a o inmovilizadas en un soporte sólido.

Las proteínas de la invención pueden comprender una marca detectable como, por ejemplo, una marca radioactiva, fluorescente o de biotina. Esto resulta particularmente práctico en las técnicas de inmunoensayo.

50 Las proteínas pueden tomar diversas formas ( por ejemplo nativas, de fusión, glicosiladas, no glicosiladas, lipídicas, puentes disulfuro, etc). En la forma preferente las proteínas son proteínas meningocócicas.

55 En la forma preferente, las proteínas se preparan de forma sustancialmente pura o sustancialmente aislada (es decir, sustancialmente libre de otros Neisseria o proteínas celulares del huésped) o de forma sustancialmente aislada. En general, las proteínas se proporcionan en un medio no natural, por ejemplo, se separan de sus medio natural. En ciertas realizaciones, la proteína sujeto está presente en una composición enriquecida para la proteína en comparación al control. Por definición, la proteína purificada se presenta a través de la cual purificado significa que la proteína se presenta en una composición sustancialmente libre de otras proteínas expresadas, en la que sustancialmente significa que menos del 90 %, normalmente menos del 60 % y más normalmente menos del 50 % de la composición está realizada de otras proteínas expresadas.

60 El término “proteína” aquí utilizado se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, pueden comprender aminoácidos modificados y pueden estar interrumpidos por ácidos no aminados. El término también abarca un polímero aminoácido que ha sido modificado de manera natural o por intervención como, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o

cualquier otra manipulación o modificación tales que la conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en las definiciones las proteínas que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos artificiales, etc), así como otras modificaciones conocidas en la disciplina. Las proteínas pueden darse como cadenas únicas o cadenas asociadas.

5 La invención puede utilizar proteínas con una o más de las SECs ID N° 77, 79, 82, 83, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 y 94.

10 Como se ha mencionado anteriormente, NMB1870 puede utilizarse en forma de proteína de fusión, aunque las proteínas también pueden ser expresadas de otra manera que como proteínas de fusión (por ejemplo, sin GST, MBP, con marca de polihistidina o similar).

15 Las proteínas de fusión pueden tener una pareja de fusión C – Terminal o N – Terminal. Cuando se utiliza una pareja de fusión N – Terminal con las SECs ID 1 a 23, el experto podrá ver que el codón inicial se expresará (si se incluye) como una valina, ya que GTG se traduce como valina excepto cuando se utiliza como codón inicial, en cuyo caso se traduce como N – formilmetionina.

20 Las parejas de fusión aptas incluyen péptidos guía de otras proteínas (en particular, de otras lipoproteínas), que pueden sustituirse por los péptidos guía naturales NMB1870 (es decir, la secuencia anterior a la cisteína N – Terminal puede reemplazarse con otro péptido guía de interés). Se pueden citar como ejemplos las secuencias que comprenden SEC ID N° 46 y la secuencia guía de lipoproteínas P4 de *H. influenzae* [ejemplo 17].

### **Otros componentes antigénicos**

25 Las composiciones de la invención incluyen un pequeño número (por ejemplo menor a  $t$  antígenos, donde  $t$  es 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3) de antígenos purificados del serotipo B. Es particularmente preferible que la composición no debería incluir complejos o mezclas no definidas de antígenos, por ejemplo, es preferible no incluir vesículas de la membrana externa en la composición. Los antígenos se expresan, preferiblemente, de manera recombinante en un huésped heterólogo y, a continuación, se purifican.

30 La composición de la invención incluye, al menos, dos proteínas NMB1870 diferentes. También puede incluir otro antígeno Neisseria, como vacuna que dirige más de un antígeno por bacteria disminuye la posibilidad de seleccionar mutantes de escape. Los antígenos Neisseria para su inclusión en las composiciones incluyen proteínas que comprenden:

- 35
- (a) Los 446 pares de SECs ID (es decir, 2, 4, 6, ..., 890, 892) descritas en la referencia 6.
  - (b) Los 45 pares de SECs ID (es decir, 2, 4, 6, ..., 88, 90) descritas en la referencia 7.
  - (c) Los 1674 pares SECs ID 2 – 3020, pares de SECs ID 3040 – 3114 y todas las SECs ID 3115 – 3241 descritas en la referencia 8.
  - 40 (d) Las 2160 secuencias aminoácidas de NMB0001 a NMB2160 de la referencia 2.
  - (e) Una secuencia aminoácida descrita en las referencias 10, 11 o 12.
  - (f) Una variante, un homólogo, un ortólogo, un parálogo, un mutante, etc. de (a) a (e); o
  - (g) Una vesícula de la membrana externa preparada a partir de *N. meningitidis* [véase, por ejemplo, la referencia 139].

45 Además de los antígenos Neisseria, la composición puede incluir antígenos para inmunizar contra otras enfermedades o infecciones. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los siguientes antígenos:

- 50
- Antígenos de *Helicobacte pylori* como CagA [18 a 21], VacA [22, 23], NAP [24, 25, 26], HopX [por ejemplo 27], HopY [por ejemplo 27] y / o ureasa.
  - Un antígeno sacárido del serotipo A, C, W135 y / o Y de *N. meningitidis*, como el oligosacárido del serotipo C descrito en la referencia 28 [véase también la referencia 29] o los oligosacáridos de la referencia 30.
  - Un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo 31, 32 o 33].
  - Un antígeno del virus de la hepatitis A, como los virus inactivos [por ejemplo 34 o 35].
  - 55 – Un antígeno del virus de la hepatitis B, como los antígenos de superficie y / o nucleares [por ejemplo 35 o 36].
  - Un antígeno de difteria, como una anatoxina diftérica [por ejemplo el capítulo 3 de la referencia 37] tal que el mutante CRM<sub>197</sub> [ejemplo 38].
  - Un antígeno tetánico, como una anatoxina tetánica [por ejemplo el capítulo 4 de la referencia 37].
  - Un antígeno de *Bordetella pertussis*, como la holotoxina pertussis (PT) y la haemagglutinin filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y / o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo las referencias 39 y 40].
  - 60 – Un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo 29].
  - Un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo 41].
  - Un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 6, 7, 8, 42].
  - 65 – Un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplos las referencias 43 a 49].

- Un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo 50].
- Un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo 51].
- Antígeno(s) de polio [por ejemplo 52, 53] como la IVP.
- Antígeno(s) de rabia [por ejemplo 54] como virus inactivado liofilizado [por ejemplo 55, RabAvert™].
- 5 – Antígenos de sarampión, paperas y / o rubeola [por ejemplo los capítulos 9, 10 y 11 de la referencia 37].
- Antígeno(s) de gripe [por ejemplo el capítulo 19 de la referencia 37], como hemaglutinina y / o proteínas de superficie neuraminidasa.
- Un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo 56].
- Un antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo grupo B) [por ejemplo 57, 58].
- 10 – Un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo grupo B).
- Un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo grupo A) [por ejemplo 58, 59, 60].
- Un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo 61].
- Un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo 62, 63 64].
- 15 – Un antígeno de un virus de la familia flaviviridae (género flavivirus), como los del virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, los cuatro serotipos del virus del Dengue, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas y el virus del Nilo Occidental.
- Un antígeno de pestivirus, como el del virus de la peste porcina clásica, el virus de la diarrea viral bovina y / o el virus de la enfermedad de la frontera.
- Un antígeno de parvovirus, por ejemplo del parvovirus B19.
- 20 – Una proteína príon (por ejemplo la proteína priónica de ECJ).
- Una proteína amiloide, como un péptido beta [65].
- Un antígeno de cáncer, como los enumerados en la Tabla 1 de la referencia 66 o en las tablas 3 y 4 de la referencia 67.

25 La composición pueden comprender uno o más de estos antígenos.

Los antígenos de proteínas tóxicas pueden modificarse cuando sea necesario (por ejemplo desintoxicación de toxina Pertussis mediante dispositivos químicos y / o genéticos [40]).

30 Cuando se incluye un antígeno de difteria en la composición, es preferible incluir también un antígeno tetánico y antígenos de Pertussis. Igualmente, cuando se incluye un antígeno tetánico, es preferible incluir también antígenos de difteria y Pertussis. Igualmente, cuando se incluye un antígeno de Pertussis, es preferible incluir también antígenos tetánicos y de difteria. Son preferibles las combinaciones DTP.

35 En la forma preferente, los antígenos sacáridos están en forma conjugada. Las proteínas portadoras para los conjugados incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [68], péptidos sintéticos [69, 70], proteínas de choque térmico [71, 72], proteínas de Pertussis [73, 74], proteína D de *H. influenzae* [75], citoquinas [76], linfoquinas [76], proteínas estreptocócicas, hormonas [76], factores de crecimiento [76], toxina A o B de *C. difficile* [77], proteínas de captación del hierro [78], etc. Una proteína portadora preferible es la anatoxina diftérica CRM197 [79].

40 Los antígenos de la composición estarán presentes a una concentración de, al menos, 1 µg / ml. En general, la concentración de cualquier antígeno será suficiente para obtener una respuesta inmunológica contra ese antígeno.

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

50 Como alternativa a emplear antígenos de proteínas en las composiciones inmunológicas de la invención, pueden utilizarse ácidos nucleicos (preferiblemente ADN, por ejemplo en forma de un plásmido) que codifican al antígeno.

55 En la forma preferente, las composiciones de la invención incluyen uno, dos o tres: (a) antígenos sacáridos de los serotipos Y, W135, C y (opcionalmente) A de Meningococo; (b) un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* de tipo B; y / o (c) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.

#### 55 Serotipos Y, W135, C y (opcionalmente) A de Meningococo

60 Las vacunas contra los serotipos A, C, W135 e Y se conocen desde hace años. Estas vacunas (MENCEVAX, ACWY™ y MENOMUNE™) están basadas en el polisacárido capsular del organismo y, aunque son efectivos en adolescentes y adultos, su respuesta inmunitaria es débil y protegen durante un corto período de tiempo y no pueden utilizarse con niños.

65 A diferencia de los antígenos de polisacáridos conjugados de estas vacunas, las vacunas recientemente aprobadas del serotipo C (Menjugate™ [80, 28], Meningitec™ y NeisVac – C™) incluyen sacáridos conjugados. Menjugate™ y Meningitec™ tienen antígenos de oligosacáridos conjugados a un portador CRM<sub>197</sub>, mientras que NeisVac – C™ utiliza el polisacárido completo (des – O – acetilado) conjugado a un portador de anatoxina tetánica. La vacuna

MenActra™ propuesta contiene antígenos sacáridos capsulares conjugados de cada uno de los serotipos Y, W135, C y A.

5 Las composiciones de la presente invención incluyen, en la forma preferente, antígenos sacáridos capsulares de uno o más de los serotipos Y, W135, C y (opcionalmente), A de Meningococo, en el que los antígenos están conjugados a proteína(s) portadora(s) y / o son oligosacáridos. Por ejemplo, la composición puede incluir un antígeno sacárido capsular del serotipo C, de los serotipos A y C, de los serotipos A, C y W135, de los serotipos A, C e Y, de los serotipos C, W135 e Y o de los cuatro serotipos.

10 La cantidad típica de cada antígeno sacárido meningocócico por dosis oscila entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo, 1 µg, 2,5 µg, 4 µg, 5 µg o 10 µg (expresado como sacárido).

15 Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de los serotipos A y C, la proporción (peso / peso) de sacárido MenA : sacárido MenC puede ser superior a 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior). Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares del serotipo Y y uno, o ambos, de los serotipos C y W135, la proporción (peso / peso) de sacárido MenY : sacárido MenW135 puede ser superior a 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior), y / o la proporción de sacárido MenY : sacárido MenC puede ser inferior a 1 (por ejemplo 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o inferior). En la forma preferente, las proporciones (peso / peso) para los sacáridos de los serotipos A:C:W135:Y son 1:1:1:1, 1:1:1:2, 4:2:1:1, 8:4:2:1, 4:2:1:2, 8:4:1:2, 4:2:2:1, 2:2:1:1, 4:4:2:1, 2:2:1:2, 4:4:1:2 y 2:2:2:1. En la forma preferente, las proporciones (peso / peso) para los sacáridos de los serotipos C:W135:Y son: 1:1:1, 1:1:2, 1:1:1, 2:1:1, 4:2:1, 2:1:2, 4:1:2, 2:2:1 y 2:1:1. Es preferible el empleo de masas sustancialmente similares de cada sacárido.

25 Los sacáridos capsulares se utilizarán normalmente en forma de oligosacáridos. Estos están formados por la fragmentación de polisacáridos capsulares purificados (por ejemplo, por hidrólisis), a lo que sigue la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

30 Preferiblemente, la fragmentación de polisacáridos se lleva a cabo para dar lugar a un grado medio de polimerización (DP) final en los oligosacáridos de menos de 30 (por ejemplo entre 10 y 20, preferiblemente 10 para el serotipo A, entre 15 y 25 para los serotipos W135 e Y, preferiblemente 15 – 20; entre 12 y 22 para el serotipo C, etc). El DP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o por ensayos de colorimetría [81].

35 Si se lleva a cabo hidrólisis, el hidrolisato se dividirá para eliminar los oligosacáridos cortos [29]. Esto puede conseguirse de diversas maneras, como la ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior o igual a 6 se eliminarán para el serotipo A, y los inferiores a 4 se eliminarán para los serotipos W135 e Y.

Los antígenos sacáridos MenC preferibles se describen en la referencia 80, como los utilizados en Menjugate™.

40 El antígeno sacárido puede modificarse químicamente. Esto resulta particularmente práctico para reducir la hidrólisis del serotipo A [82, véase a continuación]. Puede llevar a cabo la des – O – acetilación de sacáridos meningocócicos. Para los oligosacáridos, la modificación puede tener lugar antes o después de una depolimerización.

45 Cuando una composición de la invención incluye el antígeno sacárido MenA, el antígeno es preferiblemente un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo del sacárido nativo ha / han sido reemplazados por un grupo bloqueante [82]. Esta modificación mejora la resistencia a hidrólisis.

50 El número de unidades monosacáridas que cuentan con grupos bloqueantes puede variar. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades monosacáridas pueden tener grupos bloqueantes. De manera alternativa, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de las unidades monosacáridas pueden tener grupos bloqueantes. Al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 unidades monosacáridas pueden tener grupos bloqueantes.

55 Igualmente, el número de grupos bloqueantes en una unidad bloqueante puede variar. Por ejemplo, el número de grupos bloqueantes en una unidad monosacárida puede ser 1 o 2. El grupo bloqueante se encuentra, generalmente, en 3ª y / o 4ª posición de las unidades monosacáridas.

60 La unidad terminal monosacárida puede o no tener un grupo bloqueante en lugar de su hidroxilo nativo. Es preferible conservar un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad terminal monosacárida para intervenir en reacciones futuras (por ejemplo conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos pueden convertirse en grupos amino (– NH<sub>2</sub> o – MH – E, donde E es un grupo protector de hidrógeno) mediante aminación reductiva (utilizando, por ejemplo, NaBH<sub>3</sub>CN / NH<sub>4</sub>Cl), y, después, pueden regenerarse después de que otros grupos hidroxilo hayan sido convertidos en grupos bloqueantes.

65 Los grupos bloqueantes que reemplazan grupos hidroxilos pueden ser directamente accesibles mediante una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo por

otro grupo. Los derivados apropiados de grupos hidroxilo que actúan como grupos bloqueantes son, por ejemplo, carbomatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo éteres de silicio o alquilo) y acetales. Algunos ejemplos específicos de estos grupos bloqueantes son alilo, Alloc, bencilo, BOM, t – butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos bloqueantes que no son directamente accesible y que pueden reemplazar completamente el grupo hidroxilo incluyen C<sub>1-12</sub> alquilo, C<sub>13-12</sub> alquilo, C<sub>5-12</sub> arilo, C<sub>5-12</sub> arilo – C<sub>1-16</sub> alquilo, NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> (R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se definen en el párrafo siguiente), H, F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub> (C<sub>1-6</sub> alquilo), CN, CF<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>, etc. En la forma preferente, los grupos bloqueantes son grupos de retirada de electrón.

En la forma preferente, los grupos bloqueantes tienen la fórmula: – O – X – Y o – OR<sup>3</sup>, en la que X es C (O), S(O) o SO<sub>2</sub>; Y es C<sub>1-12</sub> alquilo, C<sub>1-12</sub> alcoxi, C<sub>3-12</sub> cicloalquilo, C<sub>5-12</sub> arilo o C<sub>5-12</sub> arilo – C<sub>1-6</sub> alquilo, pudiendo ser cada uno de ellos sustituido con 1, 2 o 3 grupos independientes seleccionados de F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub> (C<sub>1-6</sub> alquilo), CN, CF<sub>3</sub> o CCl<sub>3</sub>; o Y es NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>; R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son seleccionados independientemente de H, C<sub>1-12</sub> alquilo, C<sub>3-12</sub> cicloalquilo, C<sub>5-12</sub> arilo o C<sub>5-12</sub> arilo – C<sub>1-6</sub> alquilo; o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C<sub>3-12</sub>; R<sup>3</sup> es C<sub>1-12</sub> alquilo, C<sub>3-12</sub> cicloalquilo, pudiendo ser cada uno de ellos sustituido con 1, 2 o 3 grupos independientes seleccionados de F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub> (C<sub>1-6</sub> alquilo), CN, CF<sub>3</sub> o CCl<sub>3</sub>; o R<sup>3</sup> es C<sub>5-12</sub> arilo o C<sub>5-12</sub> arilo – C<sub>1-6</sub> alquilo, pudiendo ser cada uno de ellos sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub> (C<sub>1-6</sub> alquilo), CN, CF<sub>3</sub> o CCl<sub>3</sub>. Cuando R<sup>3</sup> es C<sub>1-12</sub> alquilo o C<sub>3-12</sub> cicloalquilo, se sustituye con 1, 2 o 3 grupos como se ha definido anteriormente. Cuando R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se unen para formar un grupo heterocíclico saturado significa que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto al átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> o C<sub>12</sub>). El grupo heterocíclico puede contener 1 o 2 heteroátomos (como N, O o S) además del átomo de nitrógeno. Algunos ejemplos de grupos heterocíclicos saturados de C<sub>3-12</sub> son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperacínilo, imidazolidinilo, acetidinilo y aciridinilo.

Los grupos bloqueantes – O – X – Y y – OR<sup>3</sup> pueden prepararse a partir de grupos – OH mediante procedimiento de derivatización estándar, como reacción del grupo hidroxilo con un haluro de ácido, un haluro de alquilo, un haluro de sulfonilo, etc. Por consiguiente, el átomo de oxígeno de – O – X – Y es, preferiblemente, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo – X – Y de – O – X – Y reemplaza, preferiblemente, el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

De manera alternativa, los grupos bloqueantes pueden ser accesibles mediante una reacción de sustitución, como una sustitución de Mitsunobu. Estos y otros métodos de preparación de grupos bloqueantes a partir de grupos hidroxilos son ya conocidos.

Más preferiblemente, el grupo bloqueantes es – OC (O) CF<sub>3</sub> [83], o un grupo carbomato – OC (O) NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son seleccionados independientemente de C<sub>1-6</sub> alquilo. Más preferiblemente, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son metilos, es decir, el grupo bloqueante es – OC (O) NMe<sub>2</sub>. Los grupos bloqueantes carbomatos tienen un efecto estabilizador en los enlaces glucosídicos y pueden prepararse en condiciones suaves.

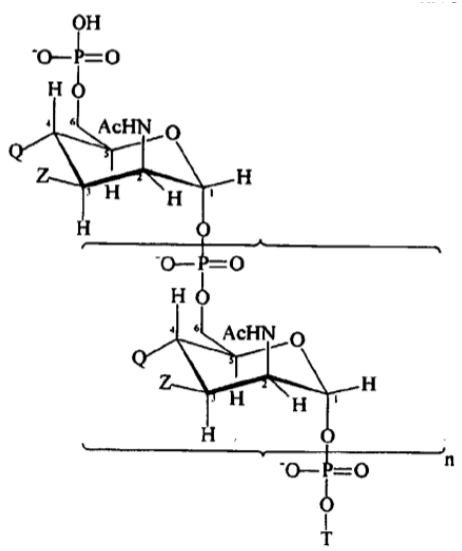
En la forma preferente, los sacaridos MenA modificados contienen *n* unidades monosacáridas, en los que, al menos, el *h* % de las unidades monosacáridas no tienen grupos – OH en ninguna de las posiciones 3 y 4. El valor de *h* es 24 o más (por ejemplo 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100) y es, preferiblemente, 50 o más. Los grupos – OH ausentes son, preferiblemente, grupos bloqueantes de los definidos anteriormente.

Otros sacaridos MenA modificados comprenden unidades monosacáridas, en los que, al menos, *s* unidades monosacáridas no tienen – OH en las posiciones 3 y 4. El valor de *s* es de, al menos, 1 (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 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 o 90). Los grupos – OH ausentes son, preferiblemente, grupos bloqueantes de los definidos anteriormente.

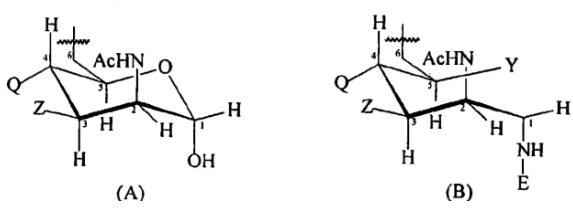
Los sacaridos MenA modificados adecuados para su utilización en la presente invención tienen la fórmula:  
, en la que



5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



n en un número entero de 1 a 100 (preferiblemente un número entero de 15 a 25);  
T es de la fórmula (A) o (B):



Cada grupo Z se selecciona independientemente de OH o de un grupo bloqueante de los descritos anteriormente; y  
Cada grupo Q se selecciona independientemente de OH o de un grupo bloqueante de los descritos anteriormente;  
Y se selecciona de OH o de un grupo bloqueante de los descritos anteriormente;  
E es H o un grupo protector de hidrógeno;  
y en la que más del 7 % (por ejemplo 8 %, 9 %, 10 % o más) de los grupos Q son grupos bloqueantes.

Cada uno de los grupos  $n + 2$  Z puede ser igual o diferente uno de otro. Igualmente, cada uno de los grupos  $n + 2$  Q puede ser igual o diferente uno de otro. Todos los grupos Z pueden ser OH. Alternativamente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de los grupos Z pueden ser OAc. Preferiblemente, aproximadamente el 70 % de los grupos Z son OAc, siendo el resto de grupos Z OH o grupos bloqueantes de los descritos anteriormente. Al menos el 7 % de los grupos Q son grupos bloqueantes. Preferiblemente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso el 100 % de los grupos Q son grupos bloqueantes.

Los polisacáridos capsulares meningocócicos se preparan mediante un proceso que conlleva etapas de precipitación de polisacáridos (por ejemplo utilizando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción con fenol frío (para eliminar proteínas) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [por ejemplo la referencia 84]. Un proceso más apropiado [30] incluye, sin embargo, la precipitación de polisacáridos seguida de solubilización de polisacáridos precipitados utilizando un alcohol bajo. La precipitación puede conseguirse gracias a un detergente catiónico como sales de tetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo sales de bromuro), o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Es preferible el uso de bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') [85]. La solubilización de material precipitado puede conseguirse gracias a un alcohol bajo como metanol, propanol, isopropanol, butanol, 2-butanol, isobutanol, terbutanol, glicoles, etc., pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar complejos CTAB – polisacárido. El etanol es añade, preferiblemente, al polisacárido precipitado para dar una concentración final (basada en el contenido total de etanol y agua) de entre el 50 % y el 95 %.

Tras la resolubilización, el polisacárido puede tratarse para eliminar contaminantes. Esto resulta especialmente importante en situaciones en las que una mínima contaminación es inaceptable (por ejemplo para la producción de vacunas humanas). Este proceso conlleva una o más etapas de filtración, por ejemplo filtración en profundidad, filtración a través de carbón activado, filtración por tamaño y / o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para continuar con el tratamiento y / o el procesado. Esto puede conseguirse mediante intercambio catiónico (por ejemplo añadiendo sales de calcio o sodio).

Como alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares de la presente invención pueden obtenerse mediante

síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se describe en la referencia 86 y la síntesis de MenA en la referencia 87.

5 Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de, al menos, dos serotipos de *N. meningitidis*. Los sacáridos se preparan, preferiblemente, por separado (incluyendo cualquier fragmentación, conjugación, modificación, etc.) y, a continuación, se mezclan para dar una composición de la invención.

10 Sin embargo, cuando la composición incluye sacáridos capsulares del serotipo A, es preferible que el sacárido del serotipo A no se combine con otro(s) sacárido(s) hasta antes de su uso, para minimizar así el potencial de la hidrólisis. Estos pueden conseguirse convenientemente teniendo el componente del serotipo A (normalmente junto a los excipientes adecuados) en forma liofilizada y el resto de componentes del serotipo en forma líquida (también junto a los excipientes adecuados), utilizando los componentes líquidos para reconstituir el componente liofilizado MenA cuando se vaya a utilizar. Cuando se emplea una sal de aluminio adyuvante, es preferible incluir el adyuvante en el vial que contiene la vacuna líquida, para liofilizar el componente MenA sin adyuvante.

15 Por consiguiente, una composición de la invención puede prepararse a partir de un kit que contiene: (a) sacárido capsular del serotipo A de *N. meningitidis* en forma liofilizada; y (b) los demás antígenos de la composición en forma líquida. La invención también proporciona un método para preparar una composición de la invención, incluyendo la mezcla del sacárido capsular del serotipo A de *N. meningitidis* liofilizado con el resto de antígenos, en la que dichos antígenos están en forma líquida.

20 En cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual será de entre 1 µg y 50 µg (medidos en masa de sacárido), siendo preferible 2,5 µg, 5 µg o 10 µg de cada uno. Con proporciones en peso de A:C:W135:Y de 1:1:1:1, 1:1:1:2, 4:2:1:1, 8:4:2:1, 4:2:1:2, 8:4:1:2, 4:2:2:1, 2:2:1:1, 4:4:2:1, 2:2:1:2, 4:4:1:2 y 2:2:2:1, además, la cantidad representada por el número 1 es preferiblemente 2,5 µg, 5 µg o 10 µg. Para una proporción 1:1:1:1 de una composición de A:C:W:Y y 10 µg por sacárido, se administran, además, 40 µg de sacárido por dosis. En la forma preferente la composiciones tiene los siguientes µg de sacárido por dosis:

A	10	0	0	0	10	5	2,5
C	10	10	5	2,5	5	5	2,5
W135	10	10	5	2,5	5	5	2,5
Y	10	10	5	2,5	5	5	2,5

30 En la forma preferente, las composiciones de la invención comprenden menos de 50 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 40 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 30 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 25 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 20 µg de sacárido meningocócico por dosis. En la forma preferente, otras composiciones comprenden menos de 10 µg de sacárido meningocócico por dosis pero, idealmente, las composiciones de la invención comprenden, al menos, 10 µg de sacárido meningocócico por dosis.

35 Los conjugados Menjugate™ y NeisVac™ emplean adyuvante hidróxido, mientras que Meningitec™ utiliza un fosfato. Las composiciones de la invención pueden adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos asociados a un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes frente a los serotipos, por ejemplo, se encuentran disponibles las siguientes permutaciones:

Serotipo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)															
A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

45 Para combinaciones trivalentes de *N. meningitidis*, se encuentran disponibles las siguientes permutaciones:

Serotipo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

Haemophilus influenzae B

5 Cuando la composición incluye un antígeno de *H. influenzae* B, normalmente será un antígeno sacárido capsular Hib. Los antígenos sacárido de *H. influenzae* B ya se conocen.

10 Ventajosamente, el sacárido Hib se conjuga covalentemente a una proteína portadora para mejorar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos en general y del polisacárido capsular Hib en particular, está muy documentada [por ejemplo las referencias 88 a 96, etc.]. La invención puede utilizar cualquier Hib conjugado apropiado. Se describen a continuación proteínas portadoras apropiadas; para los sacáridos Hib, los vehículos preferibles son CRM<sub>197</sub> ("HbOC"), anatoxinas tetánicas ("PRP – T") y el complejo de membrana externa de *N. meningitidis* ("PRP – OMP").

15 La parte sacárida del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo polirribosil ribitol fosfato (PRP)), pero es preferible hidrolizar polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo MW de 1 a 5 kDa).

Un conjugado preferible comprende un oligosacárido Hib unido covalentemente a CRM<sub>197</sub> mediante una unión de ácido lipídico [97, 98]. Una anatoxina tetánica también es un vehículo preferible.

20 Las composiciones de la invención pueden comprender más de un antígeno Hib.

25 Cuando una composición incluye un antígeno sacárido Hib, es preferible que no incluye un hidróxido de aluminio adyuvante. Si la composición incluye un fosfato de aluminio adyuvante, el antígeno Hib puede ser adsorbido por este [99] o puede no ser adsorbido [100].

Los antígenos Hib pueden ser liofilizados, por ejemplo, junto a antígenos meningocócicos.

Streptococcus pneumoniae

30 Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, normalmente será un antígeno sacárido capsular, preferiblemente conjugado a una proteína portadora [por ejemplo las referencias 31 a 33]. Es preferible incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se utilizan con frecuencia mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes, así como vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [101]. Por ejemplo, PrevNav<sup>TM</sup> [102] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F), estando cada sacárido conjugado individualmente a CRM<sub>197</sub> mediante aminación reductiva, con 2 µg de cada sacárido por 0,5 ml de dosis (4 µg de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos en un fosfato de aluminio adyuvante. En la forma preferente, las composiciones de la invención incluyen, al menos, serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden ser adsorbidos en un fosfato de aluminio.

40 Como alternativa al uso de antígenos sacárido para pneumococo, la composición puede incluir uno o más antígenos polipeptídicos. Las secuencias genómicas de varias cepas de pneumococo están disponibles [103, 104] y pueden ser sujeto de la vacuna inversa [105 – 108] para identificar antígenos polipeptídicos apropiados [109, 110]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los siguientes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128 y Sp130, como se define en la referencia 111.

45 En algunas realizaciones, la composición puede incluir antígenos tanto sacáridos como polipeptídicos de pneumococo. Esta puede emplearse como una simple mezcla o puede conjugarse el antígeno sacárido de pneumococo a una proteína pneumocócica. Las proteínas portadoras apropiadas para dichas realizaciones incluyen los antígenos enumerados en el párrafo anterior [111].

50 Los antígenos pneumocócicos pueden liofilizarse, por ejemplo, junto a antígenos meningocócicos y / o Hib.

Conjugación covalente

55 Los sacáridos capsulares de las composiciones de la invención se conjugan, normalmente, a proteína(s) portadora(s). En general, la conjugación mejora la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte de antígenos T – independientes en antígeno T – dependientes, permitiendo de este modo la inducción de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente práctica para su uso en vacunas pediátricas y es una técnica ya conocida [por ejemplo repasada en las referencias 11 y 88 – 96].

60 Las proteínas portadoras preferibles son toxinas y anatoxinas bacterianas, como la anatoxina diftérica o tetánica. Es preferible la toxina diftérica mutante de CRM<sub>197</sub> [79, 113, 114]. Otras proteínas portadoras aceptables incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [68], péptidos sintéticos [69, 70], proteínas de choque térmico [71, 72], proteínas de Pertussis [73, 74], citoquinas [76], linfoquinas [76], hormonas [76], factores de crecimiento [76], proteínas artificiales con múltiples epítopos de células T + CD4 humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [115], proteína D de *H. influenzae* [75, 116], proteína de superficie pneumocócica PspA [117], proteínas

de captación del hierro [78], toxina A o B de *C. difficile* [77], etc. En la forma preferente, los vehículos con anatoxina diftérica, anatoxina tetánica, proteína D de *H. influenzae* y CRM<sub>197</sub>.

5 En una composición de la invención, es posible utilizar más de una proteína portadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de supresión del portador. Por consiguiente, las proteínas portadoras pueden utilizarse para diferentes serotipos, por ejemplo, los sacáridos del serotipo A pueden conjugarse a CRM<sub>197</sub>, mientras los sacáridos del serotipo C pueden conjugarse a anatoxinas tetánicas. También es posible utilizar más de una proteína portadora para un antígeno sacárido en particular, por ejemplo, los sacáridos del serotipo A pueden estar en dos grupos, algunos conjugados a CRM<sub>197</sub> y otros conjugados a anatoxinas tetánicas. Sin embargo, en general es preferible emplear la misma proteína portadora para todos los sacáridos.

15 Una única proteína portadora puede portar más de un antígeno sacárido [118]. Por ejemplo, una única proteína portadora puede haber conjugado sacáridos de los serotipos A y C. Para conseguir esto, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general es preferible tener conjugados separados para cada serotipo.

20 En la forma preferente, los conjugados con un sacárido : proteína tienen una proporción (peso / peso) de entre 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido). Son preferibles las proporciones entre 1:2 y 5:1 y más preferibles las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Es preferible un exceso de proteína portadora para MenA y MenC.

25 Los conjugados pueden utilizarse en conjunción con proteínas portadoras libres [119]. Cuando una proteína portadora dada se presenta como libre y como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es, preferiblemente, inferior al 5 % de la cantidad total de proteína portadora en la composición total, y más preferiblemente inferior al 2 % en peso.

Puede emplearse cualquier reacción de conjugación apropiada, con cualquier enlace de unión necesario.

30 El sacárido se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede conllevar, por ejemplo, reactivos de cianilación como CDAP (por ejemplo 1 – ciano – 4 – dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [120, 121]). Otras técnicas apropiadas emplean carbodiimidias, hidrácidos, ésteres activos, norbornano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción de la referencia 94).

35 Los enlaces mediante grupo de enlace puede llevarse a cabo empleando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 122 y 123. Un tipo de enlace conlleva la aminación reductiva del polisacárido, acoplado el grupo amino resultante a un extremo de un grupo de enlace de ácido adípico y, a continuación, acoplado una proteína al otro extremo del grupo de enlace de ácido adípico [92, 124, 125]. Otros enlaces incluyen B – propionamido [126], nitrofenil – etilamina [127], haloacil haluro [128], enlaces glucosídicos [129], ácido 6 – aminocaproico [130], ADH [131], partes C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [132], etc. Como alternativa a la utilización de un enlace, puede utilizarse un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden incluir oxidación del polisacárido seguida de aminación reductiva con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 133 y 134.

45 Es preferible un proceso en el que se introduzcan los grupos amino en el sacárido (por ejemplo reemplazando los grupos =O terminales con – NH<sub>2</sub>) seguido de derivatización con un diéster adípico (por ejemplo diéster de ácido adípico N – hidroxisuccinimida) y de una reacción con la proteína portadora. Otra reacción preferible utiliza activación CDAP con una proteína portadora D, por ejemplo para MenA o MenC.

50 Tras la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Hay numerosos métodos, incluyendo la cromatografía hidrofóbica, la ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las referencias 135 y 136, etc.].

#### Vesículas de la membrana externa

55 Es preferible que las composiciones de la invención no incluyan complejos o mezclas indefinidas de antígenos, algo característico de las OMVs. Sin embargo, una de las maneras en las que se puede aplicar la invención a las OMVs es cuando las OMVs se administran en series de dosis múltiples.

60 Cuando se administra más de una OMV, cada dosis puede ser suplementada (ya sea añadiendo la proteína purificada o por la expresión de la proteína en la bacteria de la que derivan las OMVs) por la primera, segunda o tercera proteína como se describió anteriormente. Preferiblemente, las dosis diferentes se suplementan con diferentes variantes de NMB1870. En una serie de tres dosis de OMV, por ejemplo, cada dosis podría contener una primera proteína, una segunda proteína y una tercera proteína diferente de manera que, tras recibir las tres dosis de OMVs, se habrían recibido las tres variantes. En una serie de dos dosis de OMV, se podría utilizar una variante por dosis de OMV (omitiendo, por tanto, una variante), o una o ambas dosis de OMV podrían suplementarse con más de una variante para cubrir las tres variantes. En la forma preferente de realización, hay tres dosis de OMV y cada una

65

contiene tras poblaciones de vesículas modificadas genéticamente diferentes, cada una con tres subtipos, dando de este nueve subtipos diferentes en total.

Este planteamiento puede utilizarse, en general, para mejorar las preparaciones de microvesículas del serotipo B [137] de *N. meningitidis*, "OMVs nativas" [138], ampollas o vesículas de la membrana externa [por ejemplo las referencias 139 a 144, etc.]. Estas pueden prepararse a partir de bacterias que han sido genéticamente manipuladas [145 – 148] para, por ejemplo, aumentar la inmunogenicidad (por ejemplo hiperexpresión de genes), reducir la toxicidad, inhibir la síntesis de polisacáridos capsulares, regular a la baja la expresión de PorA, etc. Pueden prepararse a partir de cepas con excesiva formación de *blebs* [149 – 152]. Pueden incluirse vesículas de un *Neisseria* no patógeno [153]. Las OMVs pueden prepararse sin utilizar detergentes [154, 155]. Pueden expresar proteínas no neisséricas en su superficie [156]. Pueden ser pobres en liposacáridos. Pueden mezclarse con antígenos recombinantes [139, 157]. Pueden utilizarse vesículas de bacterias con diferentes subtipos de proteína de membrana externa I, por ejemplo seis subtipos diferentes [158, 159] que utilizan dos poblaciones de vesículas genéticamente modificadas diferentes, cada una con tres subtipos, o nueve subtipos diferentes que utilizan tres poblaciones de vesículas genéticamente modificadas diferentes, cada una con tres subtipos, etc. Los subtipos apropiados incluyen: Pl.7,16; Pl.5 – 1, 2 – 2; Pl.19, 15 – 1; Pl.5 – 2,10; Pl.12 – 1,13; Pl.7 – 2,4; Pl.22,14; Pl.7 – 1,1; Pl.18 – 1,3,6.

También es posible, por supuesto, suplementar las preparaciones de vesículas con dos o tres variantes diferentes.

### **Inmunización**

La composición de la invención es, preferiblemente, una composición inmunogénica, y la invención presenta una composición inmunogénica de la invención para su utilización como medicamento.

La invención es práctica en un procedimiento para obtener una respuesta anticuerpo en un mamífero, comprendiendo la administración de una composición inmunogénica de la invención al mamífero. La respuesta anticuerpo es, preferiblemente, respuesta anticuerpo protectora y / o bactericida.

La invención es práctica en un procedimiento para proteger a un mamífero con una infección por *Neisseria* (por ejemplo meningocócica), comprendiendo la administración al mamífero de una composición inmunogénica de la invención.

La invención también presenta la utilización de, al menos, dos antígenos (a) y (b) como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para prevenir la infección por *Neisseria* en un mamífero.

El mamífero es preferiblemente humano. El humano puede ser un adulto o, preferiblemente, un niño.

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

Los usos y procedimientos resultan particularmente prácticos para prevenir / tratar enfermedades que incluyen de manera no limitante meningitis (en particular meningitis bacteriana) y bacteremia.

La eficacia del tratamiento terapéutico puede probarse analizando la infección por *Neisseria* tras la administración de la composición de la invención. La eficacia del tratamiento profiláctico puede probarse analizando las respuestas inmunes contra NMB1870 tras la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede ser determinada administrándolas para probar sujetos (por ejemplo niños de 12 a 16 meses, o modelos animales [160]) y luego determinando parámetros estándar que incluyen anticuerpos de suero bactericida (SBA) y títulos por ELISA (GTM) de la avidéz de IgG anti - capsula. Estas respuestas inmunes se determinan, normalmente, unas 4 semanas después de la administración de la composición y se comparan a los valores determinados antes de la administración de la composición. Es preferible un incremento de SBA de, al menos, 4 u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, puede realizarse más de un análisis post administración.

En la forma preferente, las composiciones de la invención pueden conferir a un paciente un título de anticuerpo superior a los criterios de seroprotección de cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Se conocen antígenos con un título de anticuerpo asociado en el que un huésped se considera seroconvertido contra el antígeno, y dichos títulos son publicados por organizaciones como la OMS. Preferiblemente más del 80 % de una muestra estadísticamente significantes de sujetos ha seroconvertido, más preferiblemente más del 90 %, más preferiblemente más del 93 % y aún más preferiblemente del 96 % al 100 %.

Las composiciones de la invención se administran, en general, directamente al paciente. La administración directa puede llevarse a cabo mediante inyección parenteral (por ejemplo de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido), o por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auricular, pulmonar u otra administración muscular. Es preferible la administración

intramuscular en el muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede realizarse con una aguja (por ejemplo una aguja hipodérmica), pero también puede realizarse de manera alternativa la inyección sin aguja. La dosis típica intramuscular es de 0,5 ml.

5 La invención puede utilizarse para obtener inmunidad sistémica y / o mucosa.

El tratamiento puede ser una única dosis o una serie de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden utilizarse como serie de inmunización primaria y / o como serie de dosis de refuerzo. Una serie primaria puede estar seguida de una serie de refuerzo. El período de tiempo adecuado entre las dosis primarias (por ejemplo entre 4 y 16 semanas) y entre las primarias y el refuerzo puede determinarse de manera rutinaria.

15 La composición inmunogénica de la invención incluye, generalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser cualquier sustancia que no induce por sí misma la producción de anticuerpos nocivos al paciente que recibe la composición, y que puede administrarse sin demasiada toxicidad. Los vehículos adecuados son numerosos, macromoléculas metabolizadas lentamente como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivos. Dichos vehículos son ya conocidos para los expertos en la disciplina. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos como agua, solución salina, glicerol y etanol. También pueden estar presentes en estos vehículos sustancias auxiliares como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras de pH y similares. Los liposomas también son vehículos adecuados. En la referencia 161 se exponen meticulosamente los vehículos farmacéuticamente aceptables.

25 Las infecciones por *Neisseria* afectan a diversas áreas del cuerpo, por eso la composición de la invención se puede preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, como soluciones líquidas o en suspensión. También pueden prepararse en forma sólida apta para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como tableta, cápsula o jarabe (se puede añadir sabor de manera opcional). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como inhalador, utilizando un polvo fino o un spray. La composición puede prepararse como un supositorio o un pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, auricular u ocular, por ejemplo, como gotas.

35 La composición es, preferiblemente, estéril. Está, preferiblemente, libre de pirógenos. Está, preferiblemente, tamponada, por ejemplo, con un pH de entre 6 y 8, generalmente alrededor de 7. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, es preferible utilizar un tampón de histidina [162]. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas respecto a los humanos.

40 Las composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de inmunogen, así como tantos otros componentes específicos como sean necesarios. Por "cantidad inmunológicamente efectiva" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una única dosis o como parte de una serie, es efectiva como tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y la condición física del individuo que se trate, la edad, el grupo taxonómico del individuo (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 valoración de la situación médica por parte del médico tratante y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad descienda en un amplio rango para que puede ser determinada mediante ensayos rutinarios. El tratamiento pos dosis puede ser una única dosis o una serie de dosis múltiples (por ejemplo incluyendo dosis de refuerzo). La composición puede administrarse junto a otros agentes inmunoreguladores.

50 Una composición inmunogénica incluye, generalmente, un adyuvante. Los adyuvantes preferidos que mejoran la efectividad de la composición incluyen de manera no limitante: (A) MF59 (5 % Squalene, 0,5 % Tween 80 y 0,5 % Span 85, formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador) [véase el capítulo 10 de la referencia 163; véase también la referencia 164]; (B) micropartículas (es decir, una partícula de ~ 100 nm a ~ 150 µm de diámetro, más preferiblemente de ~ 200 nm a 30 µm de diámetro y, más preferiblemente, de ~ 500 nm a 10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales biodegradables y no tóxicos (es decir, un poli (ácido alfa-hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), siendo preferible un poli (láctico-co-glicólico) ("PLG"), opcionalmente con una superficie cargada (por ejemplo añadiendo un detergente catiónico, aniónico o noiónico, como SDS (negativo) o CTAB (positivo) [por ejemplo las referencias 165 y 166]); (C) liposomas [véanse los Capítulos 13 y 14 de la referencia 163]; (D) ISCOMs [véase el Capítulo 23 de la referencia 163]; (E) SAF, con un 10 % Squalene, 0,4 % Tween 80, 5 % polímero de bloque plurónico L121 y thr – MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrónica o vortexado para generar una emulsión de partículas de mayor tamaño [véase el Capítulo 12 de la referencia 163]; (F) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) con un 2 % Squalene, 0,2 % Tween 80 y un componente, o más, de la pared celular bacteriana del grupo formado por monofosforilípido A (MLP), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MLP + CWS (Detox™); (G) adyuvantes saponinas, como QuilA o QS21 [véase el capítulo 22 de la referencia 163]; (H) quitosano [véase 168]; (I) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (J) citoquinas, como interleucinas (por ejemplo IL – 1, IL – 2, IL – 3, IL – 4, IL

– 5, IL – 6, IL – 7, IL – 12, etc.), interferones (por ejemplo interferón –  $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc [véanse los Capítulos 27 y 28 de la referencia 163], RC529; (K) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL – 12 (y, opcionalmente, un esteroide) [169]; (L) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3 – O – deacilado (3dM) [por ejemplo el capítulo 21 de la referencia 163]; (M) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y / o emulsiones de aceite en agua [170]; (N) oligonucleótidos con motivos CpG [171], es decir, que contienen, al menos, un dinucleótido CpG, utilizando opcionalmente 5 – metilcitosina en lugar de citoquina; (O) un éter de polietileno o un éster de polioxitileno de alquilo sulfactante junto a, al menos, otro sulfactante no iónico adicional como un octoxinol [174]; (Q) un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo un oligonucleótido CpG) y una saponina [175]; (R) un inmunoestimulador y una partícula de sal metálica [176]; (S) una saponina y una emulsión de aceite en agua [177]; (T) enterotoxina termolabil de *E. coli* (“LT”) o mutantes desintoxicados de la misma, como los mutantes K63 o R72 [por ejemplo el Capítulo 5 de la referencia 38]; (U) toxina del cólera (“CT”) o mutantes desintoxicados del mismo [por ejemplo el Capítulo 5 de la referencia 38]; (V) ARN de doble cadena; (W) sales de aluminio, como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidrofosfatos), sulfato de aluminio, etc [Capítulos 8 y 9 de la referencia 163] o sales de calcio, como fosfato de calcio; y (X) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para mejorar la efectividad de la composición [véase, por ejemplo, el Capítulo 7 de la referencia 163]. Para la inmunización parenteral son preferibles los adyuvantes de sales de calcio (fosfatos de aluminio y, en particular, hidroxifosfatos y / o hidróxidos y, particularmente, oxihidróxido) y MF59. Los mutantes tóxicos son adyuvantes mucosos preferibles. QS21 es otro adyuvante útil para NMB1870 que puede emplearse solo o junto a cualquiera de (A) a (X) como, por ejemplo, con una sal de aluminio. Las composiciones de la reivindicación 1 incluyen una sal de aluminio adyuvante. Los péptidos múridos incluyen N – acetil – muramil – L – treonil – D – isoglutamina (thr – MDP), N – acetil – nomuramil – L – alanil – D – isoglutamino (nor – MDP), N – acetilmuramil – L – alanil – D – isoglutaminil – L – alanina – 2 – (1' – 2' – dipalmitoil – sn – glicero – 3 – hidroxifosforiloxi) – etilamina (MTP – EP), etc.

### Expresión proteica

Las técnicas de expresión bacteriana son conocidas en la disciplina. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse con ARN polimerasa bacteriana y de iniciar la transcripción “corriente abajo” (3') de una secuencia codificante (por ejemplo gen estructural) en el ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que, normalmente, se encuentra próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción suele incluir un sitio de unión de ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano puede también incluir una segunda región llamada operador, que puede solapar un sitio de unión de ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), como una proteína de gen represor que puede enlazar el operador y, por tanto, inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva puede tener lugar en ausencia de elementos reguladores negativos, como el operador. Además, la regulación positiva puede lograrse mediante una secuencia de proteína de enlace de un gen activador que, cuando está presente, es una proteína activadora por catabolitos (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón *lac* en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al., (1984) Annu. Rev. Genet. 18 : 173]. La expresión regulada puede, por lo tanto, ser positiva o negativa, aumentando o reduciendo de este modo la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias de promotor útiles. Entre los ejemplos se incluyen secuencias de promotor derivados de enzimas que metabolizan azúcares, como galactosa, lactosa (*lac*) [Chang et al., (1977) Nature 198 : 1056] y maltosa. Algunos ejemplos adicionales incluyen secuencias de promotor derivadas de enzimas biosintéticas como triptófano (*trp*) [Goeddel et al., (1980) Nucl. Acids Res. 8 : 4057; Yelverton et al., (1981) Nucl. Acids Res. 9 : 731; patente US 4,738,921; EP – A – 0036776 y EP – A – 0121775]. Los promotores beta lactamasa (*bla*) [Weissmann (1981) “The cloning of interferon and other mistakes.” En *Interferon 3* (de I. Gresser)], bacteriófago lambda [Shimatake et al., (1981) Nature 292 : 128] y T5 [patente US 4,689,406] también proporcionan secuencias promotoras útiles. Otro promotor interesante es un promotor de arabinosa inducible (pBAD).

Además, los promotores sintéticos que no tienen lugar en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o bacteriófago pueden unirse con las secuencias de operón de otro promotor bacteriano o bacteriófago, creando así un promotor híbrido sintético [patente US 4,551,433]. Por ejemplo, el promotor *lac* es un promotor híbrido *trp – lac* que comprende tanto promotor *trp* como secuencias de operón *lac*, reguladas por el represor *lac* [Amann et al., (1983) Gene 25 : 167; de Boer et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir de manera natural promotores de origen no bacteriano que tiene la capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor natural de origen no bacteriano puede también acoplarse a ARN polimerasa compatible para producir niveles más altos de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema ARN polimerasa bacteriófago T7 / promotor es un ejemplo de un sistema acoplado [Studier et al., (1986) J. Mol. Biol. 189 : 113; Tabor et al., (1985) Proc Natl. Acad. Sci. 82 : 1074]. Además, un promotor híbrido también puede estar compuesto de un promotor bacteriófago y una región operadora de *E. coli* (EPO – A – 0267851).

Además de la secuencia promotora funcional, un sitio de unión de ribosomas también es útil para la expresión de

genes extraños en procariotas. En *E. coli*, el sitio de unión de ribosomas se denomina secuencia Shine – Dalgarno (SD) e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3 a 9 nucleótidos localizada de 3 a 11 nucleótidos arriba del codón de inicio [Shine et al., (1975) *Nature* 254 : 34]. La secuencia SD favorece la unión de ARNm al ribosoma mediante el apareamiento de bases entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNm 16S de *E. coli* [Steitz et al., (1979) “*Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA.*” En *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (de. R. F. Goldberger)]. Para expresar genes eucariotas y procariotas con sitios de unión de ribosomas débiles [Sambrook et al., (1989) “*Expression of cloned genes in Escherichia coli.*” En *Molecular Cloning: A laboratory Manual*].

Una secuencia promotora puede estar unida directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido del extremo N – Terminal siempre será una metionina, codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina del extremo N – Terminal puede ser desprendida de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o por incubación, tanto *in vivo* como *in vitro*, con una peptidasa de N – Terminal de metionina bacteriana (EP – A – 0219237).

Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por bacterias son regiones reguladoras localizadas en el extremo 3' del codón de terminación de la traducción, y, por tanto, junto al promotor que flanquea la secuencia codificante. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede ser traducido al polipéptido codificado por el ADN. Las secuencias de terminación de la transcripción suelen incluir secuencias de ADN de unos 50 nucleótidos, capaces de formar estructuras tallo – lazo que ayudan a terminar la transcripción. Algunos ejemplos incluyen secuencias de terminación de la transcripción derivadas de genes con promotores fuertes, como el gen *trp* en *E. coli* y otros genes biosintéticos.

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, incluyendo un promotor, la secuencia de señal (si se desea), la secuencia codificante de interés y la secuencia de terminación de la transcripción, se unen en constructos de expresión. Los constructos de expresión son, a menudo, conservados en un replicón, como un elemento extracromosómico (por ejemplo plásmidos) capaz de mantenerse estable en un huésped, como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo así que se mantenga en un huésped procariota o para la expresión, clonación o amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido de alto o bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias tiene, en general, un número de copias que oscila entre 5 y 200 y suele estar en 10 y 150. Un huésped que contenga un plásmido de alto número de copias contendrá, preferiblemente, al menos 10 y, más preferiblemente, al menos 20 plásmidos. Puede seleccionarse tanto un vector de alto número de copias como de bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña del huésped.

Alternativamente, los constructos de expresión pueden integrarse en el genoma bacteriano con un vector integrativo. Los vectores integrativos suelen contener, al menos, una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite al vector integrarse. Las integraciones parecen ser resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores integrativos constructos con ADN de diversas cepas de *Bacillus* integran el cromosoma del *Bacillus* (EP – A – 0127328). Los vectores integrativos también pueden estar compuestos de secuencias de bacteriófagos o transposones.

Normalmente, los constructos de expresión extracromosómica e integrativa pueden contener marcadores seleccionables que permitan seleccionar las cepas bacterianas que han sido transformadas. Los marcadores seleccionables pueden expresar en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que vuelven a la bacteria resistente a fármacos como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina) y tetraciclina [Davies et al., (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32 : 496]. Los marcadores seleccionables pueden también incluir genes biosintéticos, como los que existen en las secuencias biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

Alternativamente, algunos de los componentes anteriormente descritos, pueden estar juntos en vectores de transformación. Los vectores de transformación suelen estar compuestos de un marcador seleccionable que se mantiene en un replicón o se desarrolla en un vector integrativo, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de expresión y transformación, tanto replicones extracromosómicos como vectores de integración, se ha desarrollado para la transformación en numerosas bacterias. Por ejemplo, los vectores de expresión se han desarrollado para, *inter alia*, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* [Palva et al., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5582; EP – A – 0036259 y EP – A – 0063953; WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake et al., (1981) *Nature* 292 : 128; Amann et al., (1985) *Gene* 40 : 183; Studier et al., (1986) *J. Mol. Biol.* 759 : 113; EP – A – 0036776, EP – A – 0136829 y EP – A – 0136907], *Streptococcus cremoris* [Powell et al., (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 655]; *Streptococcus lividans* [Powell et al., (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 655], *Streptomyces lividans* [patente US 4,745,056].

Los procedimientos de introducción de ADNs exógenos en huéspedes bacterianos se conocen en la disciplina y, normalmente, incluyen la transformación de bacterias tras con  $\text{CaCl}_2$  u otros agentes, como cationes divalentes y DMSO. El ADN también puede introducirse en células bacteriana por electroporación. Los procedimientos de transformación varían según la especie de la bacteria que se va a transformar. Véase por ejemplo [Masson et al., (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60 : 213; Palva et al., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5582; EP – A – 0036259 y



EP – A – 0063953; WO 84/04541, Bacillus], [Miller et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 55 : 856; Wang et al., (1990) J. Bacteriol. 772 : 949, Campylobacter], [Cohen et al., (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69 : 2110; Dower et al., (1988) Nucleic Acids Res. 76 : 6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of Escherichia coli with ColEI-derived plasmids. In Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering." (eds. H.W. Boyer and S. Nicosia); Mandel et al., (1970) J. Mol. Biol. 53 : 159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949 : 318; Escherichia], [Chassy et al., (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44 : 173 Lactobacillus]; [Fiedler et al., (1988) Anal. Biochem. 770 : 38, Pseudomonas]; [Augustin et al., (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66 : 203, Staphylococcus], [Barany et al., (1980) J. Bacteriol. 744 : 698; Harlander (1987) "Transformation of Streptococcus lactis by electroporation, in: Streptococcal Genetics" (ed. J. Ferretti and R. Curtiss III); Perry et al., (1981) Infect. Immun. 32 : 1295; Powell et al., (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54 : 655; So kuti et al., (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 7 : 412, Streptococcus].

### General

15 El término "que comprende" significa "que incluye" así como "formado por", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

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

20 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.

25 "Identidad de secuencia" se determina, preferiblemente, por el algoritmo de Smith – Waterman como se utilizó en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda por huecos afines con los parámetros *gap open penalty* = 12 y *gap extension penalty* = 1.

30 Tras el serotipo, la clasificación meningocócica incluye serogrupo, serosubtipo y, después, inmunotipo, y la nomenclatura estándar los clasifica como serotipo, serogrupo, serosubtipo e inmunotipo, cada uno separado por un colon, por ejemplo B : 4 : P1,15: L3, 7, 9. En el serotipo B, algunas cepas causan, a menudo, enfermedades (hiperinvásiva), algunas cepas causan formas más severas de enfermedad que otras (hipervirulenta), y otras no causan casi enfermedades. Se conocen siete cepas hipervirulentas, llamadas subtipo I, III y IV – I, complejo ET – 5, complejo ET – 37, cúmulo A5 y cepa 3. Estas han sido definidas por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero también se ha utilizado tipificación multilocus de secuencias (MLST) para clasificar [referencia 16]. Los cuatro grupos hipervirulentos principales son los complejos ST32, ST44, ST8 y ST11.

40 El término "alquilo" se refiere a los grupos alquilo tanto de cadena recta como de cadena ramificada. El grupo alquilo puede verse interrumpido por 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por – O – , – NH – o – S –. El grupo alquilo puede también verse interrumpido por 1, 2 o 3 enlaces dobles y / o triples. Sin embargo, el término "alquilo" se refiere, normalmente, a grupos alquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos o interrupciones de enlaces dobles o triples. Cuando se hace referencia a alquilo de C<sub>1-12</sub>, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>). De manera similar, cuando se hace referencia a alquilo de C<sub>1-6</sub>, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>).

45 El término "cicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalquilenos, así como combinaciones de los mismos con grupos alquilo, como grupos cicloalquilo. El grupo cicloalquilo puede verse interrumpido por 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por – O – , – NH – o – S –. Sin embargo, el término "cicloalquilo", normalmente, se refiere a grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos. Algunos ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C<sub>3-12</sub>, se entiende que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>).

50 El término "arilo" aquí utilizado se refiere a un grupo aromático como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a arilo de C<sub>5-12</sub>, se entiende que el grupo arilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (por ejemplo C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>).

El término "C<sub>5-12</sub> arilo – C<sub>1-6</sub> alquilo" se refiere a grupos como bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

60 Los grupos protectores del nitrógeno incluyen grupos sililo (como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (como ftalimidias, trifluoroacetamidias, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t – butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), 9 – fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2 – (trimetilsililo) etoxi carbonil, 2, 2, 2 – tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (como β – trimetilsililetanosulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, C<sub>1-12</sub> alquilo, bencilo, benzhidrol, tritilo, 9 – fenilfluorenil, etc. Un grupo protector del nitrógeno preferido es Fmoc.

65

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la secuencia nucleótida de la región corriente arriba de NMB1870.

La Figura 2 es una representación esquemática de la estructura de proteínas TbpB y de antígenos NMB2132 y NMB1870. Se indican los péptidos señal y las regiones proximales ricas en glicina. Se indican cinco cajas conservadas por diferentes motivos y sus posiciones están mapeadas en la secuencia proteínica.

La Figura 3 muestra el incremento de los niveles de NMB1870 en *N. meningitidis* MC58 durante la curva de crecimiento.

La Figura 4 muestra el incremento de los niveles de NMB1870 en el sobrenadante en el mismo período. Los niveles de PorA y NMB1380 no incrementan. Los números sobre las líneas se refieren a la OD<sub>620nm</sub> del cultivo. KO indica un mutante *knockout* NMB1870 de MC58, y Wcl se mantiene para el control del lisado de células.

La Figura 5 muestra OMVs probadas con anti – NMB1870.

La Figura 6 muestra análisis FACS de MC58 encapsulado o un mutante MC58 no encapsulado utilizando anti – NMB1870.

La Figura 7 es un Western blot de un gradiente de geles SDS – PAGE cargado con lisados celulares de altos (líneas 1 y 2), medios (3 y 4) y bajos (5 y 6) expresores NMB1870. La línea 7 contiene un NMB1870 *knockout* de MC58. Las líneas son: (1) MC58; (2) H44 / 76; (3) NZ394 / 98; (4) 961 – 5945; (5) 67 / 00; (6) M1239; (7) MC58nmb1870.

La Figura 8 muestra FACS y títulos bacterianos para cada expresador alto, medio y bajo y también para el NMB1870 *knockout*. Los expresores medio y bajo tienen secuencias aminoácidas NMB1870 idénticas, con un 91,6 % de emparejamiento con MC58.

La Figura 9 es un dendrograma que muestra el grupo de cepas según las distancias de la proteína NMB1870. Las etiquetas “1”, “2” y “3” indican las tres variantes. Los números en los corchetes indican el número de cepas con secuencia idénticas presentes en cada rama del dendrograma. Se indican las razas hipervirulentas, seguidas del número de cepas cuando este es diferente del número total. Los serotipos diferentes de B también se muestran. Las cepas de tres tipos (MC58, 961 – 5965 y M1239) y otras cepas utilizadas en el análisis serológico están en círculos.

La Figura 10 es una secuencia de alineación de la variante 1 (MC58), la variante 2 (961 – 5945) y la variante 3 (M1239). Los números aminoácidos comienzan a partir de la cisteína que se supone el primer aminoácido de la proteína madura. Los fondos gris y negro indican residuos conservados e idénticos, respectivamente.

La Figura 11 muestra análisis FACS de suero contra la variante 1 (primera fila), la variante 2 (segunda fila) y la variante 3 (tercera fila), utilizando la cepa de la variante 1 (MC58), la variante 2 (961 – 5945) y la variante 3 (M1239). El suero de control contra el polisacárido capsular se muestra en la fila 4 (anticuerpo monoclonal Seam3). El suero de control contra una proteína citoplasmática se muestra en la fila 5 (anti – NMB1380). La fila 6 contiene los mutantes *knockout* (KO) de cada cepa, probada con antisuero homólogo.

La Figura 12 (variante 1), 13, (variante 2), y 14 (variante 3) muestran dendrogramas para tres variantes separadas de NMB1870, clasificados por tipos multilocus de secuencias (ST).

## MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

### **NMB1870 en la cepa MC58 del serotipo B – identificación del codón de inicio**

El gen NMB1870 se identificó en las secuencias genómicas de MenB y MenA publicadas por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR) y el Sanger Center, respectivamente [2, 4; NMB1870 y NMA0586]. Sin embargo, hay una discrepancia sobre la posición de codón de inicio ATG como el codón de inicio MenB es 120bp corriente arriba del codón de inicio MenA. En contraste a ambas anotaciones de trabajos anteriores, la presente invención sitúa el codón de inicio como un codón GTG que está corriente abajo de los codones de inicio del trabajo anterior (18bp corriente abajo para MenA, 138bp para MenB) y coincide con la referencia 8.

Como se muestra en la Figura 1, el codón de inicio GTG (+1) es consistente con la presencia de un sitio de unión de ribosomas correctamente separado y con la predicción de la señal lipoprotéica. El codón de inicio MenB del trabajo anterior de TIGR se muestra en una caja, y el codón de inicio de Sanger se muestra en un círculo. Los repetidos invertidos se muestran por flechas horizontales.

NMB1870 es un gen monocistrónico localizado 157 bases corriente abajo del codón de terminación del gen nmb1869 fructosa-bifosfato aldolasa. En MenA Z2491 la organización global es similar, pero 31 pares de bases (bp) corriente arriba del codón de inicio GTG hay una inserción de 186 nucleótidos que son homólogos a una región

interna de repetición de IS1106 y están flanqueadas por dos pares de 16 bases repetidas invertidas. Un sitio de unión supuesta de ribosomas (matizado) está presente 8 bp corriente arriba del codón de inicio GTG. Una caja *fur* (11 / 19 emparejamientos con el consenso de caja *fur* de *E. coli* [178], SECs ID N° 74 y 75) se localiza 35 bp corriente arriba del codón de inicio, como se predijo con los FindPatterns GCG de inicio de la SEC ID N° 75 y permite un máximo de nueve malemparejamientos. Las secuencias promotoras supuestas también fueron detectadas.

Se utilizó la suite GCG Wisconsin Package (version 10.0) para el análisis de secuencia por ordenador de las secuencias génicas y protéicas. El programa PSORT [179] se utilizó para la predicción de la localización. NMB1870 tiene la señal típica de una lipoproteína de superficie expuesta, caracterizada por un péptido señal con un motivo caja - lipo del tipo - Lu - X - X - Cys - , donde la Cisteína estaba seguida de Serina, un aminoácido asociado generalmente con la localización de la membrana externa de lipoproteínas [180]. La caja - lipo se pierde en el gonococo debido a una inserción de base única desplazada (G) tras el nucleótido 36 de MC58, reestableciendo este desfase por una inserción 8 bp tras la posición 73.

La proteína madura MC58 se predice como una lipoprotéina con un peso molecular de 26.964 Da y un pI de 7,96, y se caracteriza por la presencia de cuatro glicinas corriente abajo del motivo caja - lipo.

Un segundo análisis de predicción de estructura secundaria utilizando el programa PredictProtein [181] indica que NMB1870 es una proteína globular compuesta, en su mayoría, de beta - láminas.

### **Análisis de secuencia**

Se utilizó el algoritmo PSI - BLAST para búsquedas por homología [182] empleando bases de datos de proteínas no redundantes. No se encontró ninguna proteína no homóloga al buscar bases de datos de proteínas eucariotas y procariontes existentes no redundantes en NCBI, incluyendo el genoma humano, sugiriendo así que NMB1870 es específico para *Neisseria*. Sin embargo, se encontró una región con algo de homología (28 % de identidad para 146 aminoácidos) con la parte C - Terminal de la proteína de unión de la transferrina TfbA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* [183] (Figura 2). Una vista más cercana de esta región reveló homologías también con las proteínas de unión de la transferrina de *N. meningitidis* [184], *H. influenzae* [185], *Moraxella catarrhalis* [186] y con el antígeno de superficie NMB2132 de *N. meningitidis*, anteriormente anotado como homólogo TbpB [3].

Para ver si esta homología de secuencia refleja una homología funcional, se dializaron recombinante NMB1870 (véase a continuación), transferrina humana hTF (Sigma T - 4132) y la mezcla de los dos (concentración final de 7 µM) O / N en PBS a 4 °C. Tras la diálisis de 20 µl de cada proteína y la mezcla de ellas, se cargaron en una columna de gel de filtración (Amersham) HPLC Superdex 200 PC 3,2 / 30 utilizando PBS como tampón [187]. Se utilizaron Blue Dextran 2000 y ribonucleasa A, quimi tripsina A, ovalbúmina A y suero bovino de albúmina (amersham) con pesos moleculares estándar para calibrar la columna. El gel de filtración se realizó mediante un sistema Smart con una velocidad de flujo de 0,04 ml / min y el material eluido se analizó a 214 nm y 280 nm. (El volumen de retención NMB1870 fue 1,68 ml y 1,47 para htf.)

La proteína recombinante no se unió a la transferrina humana *in vivo*.

La caja Fur en el promotor sugiere que la expresión de NMB1870 puede regularse con hierro. Sin embargo, la expresión de la proteína no parece incrementar en condiciones de hierro bajo.

Una característica interesante de la proteína es la presencia de un segmento de cuatro glicinas corriente abajo de la cisteína lipidada. Se encuentran tres o más glicinas consecutivas corriente abajo de una cisteína lipidada también en otras cinco lipoproteínas de *N. meningitidis*, llamadas proteína B de unión de la transferrina (TbpB), componente de la membrana externa de un transportador ABC de NMB0623, proteína hipotética NMB1047, homólogo de TbpB de NMB2132 y lipoproteína AspA [188]. En ninguna de estas proteínas la secuencia poli - glicina está codificada por una prolongación poli - G, sugiriendo que esta característica no suele generar modulación antigénica.

Una búsqueda de lipoproteínas con una región rica en glicina se llevó a cabo en 22 secuencias genómicas completas recuperadas en NCBI [189] utilizando FindPatterns. La búsqueda recuperó 29 lipoproteínas en algunas pero no en todas las especies bacterianas. Los organismos con este tipo de lipoproteínas incluyen tanto bacterias Gram negativas como Gram positivas, incluyendo *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Lysteria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, mientras otras como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* y *Vibrio cholerae* no tenían ninguna. La mayoría de las lipoproteínas con esta señal pertenecen a transportadores ABC, seguidos de proteínas de función desconocida. Aunque esta característica común de la estructura primaria sugiere un papel común para las glicinas repetidas, la función es desconocida. Sin embargo, puede servir para guiar las lipoproteínas a una ruta específica de secreción y localización de superficie [190].

### **Secuenciación para otras cepas**

Se seleccionaron 70 cepas representativas de la diversidad genética y geográfica de la población de *N. meningitidis*

para una investigación más profunda de NMB1870. Las cepas derivan de 19 países diferentes, el 73 % pertenecen al serotipo B y 32 se aislaron durante los últimos cinco años. El grupo de cepas incluye, en su mayoría, cepas del serotipo B, algunas cepas de los serotipos A, C, Y, W135 y Z y una cepa de *N. gonorrhoeae* y *N. cinerea*. Las cepas se describen más detalladamente en las referencias 191 y 192. Algunas cepas se encuentran disponibles en ATCC (por ejemplo la cepa MC58 está disponible bajo la referencia Baa – 335).

El gen NMB1870 se amplificó utilizando cebadores externos a la secuencia codificadora (A1, SEC ID N° 55; y B2, SEC ID N° 56). Aproximadamente 10 ng de AND cromosómico se empleó como plantilla para la amplificación. Las condiciones de PCR fueron: 30 ciclos, 94 °C durante 40", 58 °C durante 40" y 68 °C durante 40". Los fragmentos de PCR se purificaron por el kit Qiagen QIAquick PCR Purification y se sometieron a análisis de secuencia, que se llevó a cabo empleando ABI 377 Automatic Sequencer. La secuenciación se llevó a cabo utilizando primers A1, B2, 22 (SEC ID N° 57) y 32 (SEC ID N° 58).

El gen se detectó por PCR en las 70 cepas de *Neisseria*. En *N. lactamica* se podría haber detectado un ligamiento mediante un Western blot, pero el gen no podría haberse amplificado.

La secuencia nucleótida del gen se determinó en las 70 cepas. Se codificaron un total de 23 proteínas diferentes (SEC ID N° 1 a 23). El análisis por ordenador de estas 23 secuencias, utilizando el algoritmo de Kimura y Jukes – Cantor, las dividió en tres variantes (Figura 9). El dendrograma se obtuvo comenzando el alineamiento de secuencia múltiple de las secuencias protéicas de NMB1870 (PileUP) utilizando el método Protein Sequence Parsimony Method (ProtPars), un programa disponible en el pack Phylogeny Inference (Phylip) y se confirmó con el programa GCG program Distances, utilizando los algoritmos de Kimura y Jukes – Cantor.

Se determinaron las secuencias de NMB1870 de otras 100 cepas. Muchas de ellas eran idénticas a una de las SECs ID N° 1 a 23, pero 19 secuencias únicas se presentan como las SECs ID N° 140 a 158.

Las figuras 12 a 14 muestran dendrogramas de varias secuencias, clasificadas por tipos de multilocus de secuencias ST. En la variante 1 (Figura 12) la cepa referencia es MC58, siendo la identidad de secuencia más baja con la referencia de 89,4 % contra una media del 93,7 %. En la variante 2 (Figura 13) la cepa referencia es 2996 y las secuencias tienen un 93,4 % de identidad (media de 96,3 %). En la variante 3 (Figura 14) la identidad más baja respecto a la cepa referencia M1239 es 94,7 % (media de 95,8 %). ST32cpx es el grupo hipervirulento más homogéneo, albergando solo una secuencia NMB1870 de la variante 1 (también solo una forma de NMB1343 y de NadA). La mayoría de cepas ST44cpx albergan la variante 1 (varias secuencias diferentes) de NMB1870, algunas con 3 variantes (secuencia única). Estos datos sugieren que ST32cpx está próximo a ST44cpx, en comparación a otros grupos, que coinciden con los datos basados en el genotipo de PorA (clase III). Los complejos ST11 y ST8 se representan casi siempre por secuencias diferentes en la variante 2 de NMB1870, sugiriendo que estos complejos están cercanos, en comparación a otros grupos, y coinciden con el genotipo de PorA (clase II). ST11cpx alberga las tres variantes, indicando que es el grupo hipervirulento más diverso de los cuatro.

Se seleccionaron arbitrariamente las cepas MC58, 961 – 5945 y M1239 como cepas para las variantes 1, 2 y 3, respectivamente. La identidad de secuencia entre los tres tipos de cepas se muestra en la Figura 10. La identidad aminoácida fue de 74,1 % entre las variantes 1 y 2, 62,8 % entre las variantes 1 y 3 y 84,7 % entre las variantes 2 y 3. Las secuencias en las que cada variante estaba bien conservada, la más distante muestra 916, %, 93,4 % y 93,2 % de identidad respecto a sus cepas, respectivamente. *N. cinerea* pertenece a la variante 1, y comparte un 96,7 % de homología con MC58. Como se muestra en la Figura 9, la variante 1 alberga todas las cepas de las líneas ET – 5 hipervirulentas, la mayoría de las líneas de las 3 razas, las cepas del serotipo A, dos aislados reciente de W135 y uno de ET – 37. La variante 2 alberga todas las cepas del complejo hipervirulento A4, de los serotipo Y y Z, un antiguo aislado w135 y cinco cepas de ET – 37. La variante 2 alberga cuatro únicas cepas ST, una cepa de Et – 37, una línea de cepa 3 y gonococo.

Las cepas de cada grupo y sus secuencias NMB1870 son las siguientes:

1	gbl85 (secuencia compartida con ES14784, M.00.0243291) m4030 (secuencia compartida con M3812) m2197 m2937 iss1001 (secuencia compartida con NZ394/98, 67/00, 93/114, bz198, m1390, nge28, 14996, 65/96, ISS1120, S59058, ISS1017, ISS1043, ISS1026, ISS1102, ISS1106, ISS656, ISS678, ISS740, ISS749, ISS995, ISS845, ISS1167, ISS1157, ISS1182, M4717, M6094, D8273) Inpl7592 (secuencia compartida con 00 – 241341, 00 – 241357, 2ND80, 2ND221, ISS1142) f6124 (secuencia compartida con 205900) m198/172 (secuencia compartida con bz133, gb149, nm008, nm092, ES14963, FN131218, S5902, S90307, M4105, ISS1180, FN131345) mc58 (secuencia compartida con 30/00, 39/99, 72/00, 95330, bz169, bz83, cu385, h44/76, ml 590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44/89, 14847, ES14898, Inpl5709, Inpl7391, Inp17503, FN131654, M3985,
---	--

	S590104, S9029, S9097, D8346, FN131682, ISS832, 1SS648, ISS1067, ISS1071, ISS1159) FN131217 ES14933 GB0993 M6190 F19324 ISS1113 gb0345 (secuencia compartida con M1820, ISS1082) M0445	17 secuencias, 98 cepas
2	L93/4286 m2671 961-6945 (secuencia compartida con 2996, 96217, 312294, 11327, a22, ISS1141, ISS1173, ISS759, ISS743, ISS866, F17094, NMB, SWZ107) gb013 (secuencia compartida con e32, m1090, m4287, 66094, M3153, M4407, NGH36) 860800 (secuencia compartida con 599) 95N477 (secuencia compartida con 90-18311, c11, m986, F370/85, M.00.0243143, ISS838, ISS839, ISS1092, M1569) 1000 (secuencia compartida con m1096, M2552, M4458, M5149, M6208) m3279 ( secuencia compartida con bz232, dk353, m3697, ngh38, M5258, D8221) MK82 8047 C4678 ISS1133 NG6/88 M0579 F16325	15 secuencias, 56 cepas
3	16889 m3813 m1239 ngpl65 gb355 (secuencia compartida con m3369, D8300, gb0364, M2441) gb988 [fa1090 gonococo]	7 secuencias, 11 cepas
NB: la abreviatura "gb" al principio de una cepa significa "M.01.0240".		

Las SECs ID N° 139 (cepa 220173i), 140 (cepas gb101 y ISS908) y 141 (cepa nge31) están distantes de estas tres variantes (al igual que, en menor grado, la cepa m3813).

- 5 En la variante 1, se ha visto la secuencia de la cepa Inp17592 (también se ha visto en las cepas 00 – 241341, 00 – 241357, 2ND80, 2ND221 e ISS1142) en el serotipo W135 Haji. En las cepas Haji, la secuencia NadA (SEC ID N° 143) es una recombinación de los alelos 2 y 3 [191, 192].

**Clonación, expresión y purificación en *E. coli***

- 10 Se amplificaron los genes de NM1870 por PCR a partir de las cepas MC58, 961 – 5945 y M1239 del genoma de *N. meningitidis*. Los cebadores hacia adelante e inversos se diseñaron para amplificar la secuencia codificadora de nmb1870 desprovista de la secuencia codificadora para el péptido líder supuesto. Las variantes M1239 y 961 – 5945 se encontraron no expresables en *E. coli*. Por lo tanto, se expresaron añadiendo al extremo N – Terminal la
- 15 secuencia SEC ID N° 46, presente en la proteína gonocócica pero ausente en el equivalente meningocócico. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Cepas	Hacia adelante	Inverso
MC58	CGCGGATCCCATATGGT <u>CGCCGCCGACATCG</u> ("For1"; SEC ID N° 47)	CCCGCTCGAGTTGCTTGGCGGCAAGGC ("Rev1"; SEC ID N° 48)
961 – 5945	CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCT GCAGCAGCGGAGGGT <u>CGCCGCCGACATCGG</u> ("For2"; SEC ID N° 49)	CCCGCTCGAGCTGTTTGGCGGCGATGCC ("Rev2"; SEC ID N° 50)
M1239	CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCT GCAGCAGCGGAGGGGAGGGGGTGGTGTCC ("For3"; SEC ID N° 51)	GCCCAAGCTTCTGTTTGGCGGCGATGCC ("Rev3"; SEC ID N° 52)

Los sitios de restricción, correspondientes a *NdeI* para los cebadores hacia adelante y a *XhoI* (*HindIII* para M1239) para los cebadores inversos, están subrayados. Para los cebadores hacia adelante 961 – 5945 y M1239, la parte de secuencia gonocócica está en cursiva y las secuencias meningocócicas coincidentes de NMB1870 están en negrita.

5 Las condiciones de PCR en el caso de la combinación de cebador For1 / Rev1 fueron: desnaturalización a 94 °C durante 30", hibridación a 57 °C durante 30", extensión a 68 °C durante 1 min (5 ciclos), desnaturalización a 94 °C durante 30", hibridación a 68 °C durante 30", extensión a 68 °C durante 1 min (30 ciclos). En el caso de las combinaciones de cebadores: For2 / Rev2, For3 / Rev2 y For3 / Rev3: 94 °C durante 30", 68 °C durante 1 min (5 ciclos), 94 °C durante 30", 71 °C durante 30", 68 °C durante 1 min (30 ciclos).

10 El gen completo *nmb1870* se amplificó a partir del genoma de MC58 utilizando los siguientes cebadores: f-For (CGCGGATCCCATATGAATCGAACTGCCTTCTGCTGCC; SEC ID N° 53) y f-Rev (CCCGCTCGAGTTATTGCTTGGCGGCAAGGC; SEC ID N° 54) y las siguientes condiciones: 94 °C durante 30", 58 °C durante 30", 72 °C durante 1 min (30 ciclos).

15 La PCR se llevó a cabo en aproximadamente, 10 ng de ADN cromosómico utilizando High Fidelity Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Los productos de PCR fueron diferidos con *NdeI* y *XhoI* y clonados en los sitios *NdeI* / *XhoI* depET – 21b + vector de expresión (Novagen).

20 Las proteínas recombinantes se expresaron como fusiones His – tag en *E. coli* y se purificaron con MCAC (Cromatografía de Afinidad a Metales), como se describió anteriormente [3] y se utilizó para inmunizar ratones para obtener antisuero. Se utilizó *E. coli* DH5α para las clonaciones y BL21 (DE<sub>3</sub>) para la expresión.

### 25 **Mutantes isogénicos *nmb1870* y *siaD***

Los mutantes isogénicos *knockout* en los que se truncó el gen *nmb1870* y se reemplazó con un casete antibiótico de eritromicina, se prepararon transformando las cepas MC58, 961 – 5945 y M1239 con el plásmido pBSΔ*nmb1870*ERM. Este plásmido contiene el gen resistente a la eritromicina en las regiones corriente arriba y corriente abajo de *nmb1870* de 500bp. Estas regiones se amplificaron a partir del genoma de MC58 utilizando los siguientes nucleótidos: Ufor GCTCTAGACCAGCCAGGCGCATAC (SEC ID N° 59, *XbaI* sitio subrayado); URev TCCCCGGGGACGGCATTGTTTACAGG (SEC ID N° 60, *SmaI* subrayado); DFor TCCCCGGGGCGCAAGCAATAACCATG (SEC ID N° 61, *SmaI* subrayado) y Drev CCCGCTCGAGCAGCGTATCGAACCATGC (SEC ID N° 62, *XhoI* subrayado). Se generó una cápsula mutante deficiente utilizando el mismo enfoque. El gen *siaD* se eliminó y se reemplazó con *ermC* utilizando el plásmido pBSΔ*Cap*ERM. Las regiones corriente arriba y corriente abajo de 1000 bp y 1056 bp, respectivamente, se amplificaron a partir del genoma de MC58 utilizando los siguientes cebadores: UCapFor GCTCTAGATTCTTTCCCGAACTCTC (SEC ID N° 63, *XbaI* subrayado); UcapRev TCCCCGGGGCCCGTATCATCCACCAC (SEC ID N° 64, *SmaI* subrayado); DCapFor TCCCCGGGGATCCACGAAATACCCC (SEC ID N° 65, *SmaI* subrayado) y DCapRev CCCGCTCGAGATATAAGTGG GACGGA (SEC ID N° 66, *XhoI* subrayado). Los fragmentos amplificados se clonaron en pBluescript y se transformaron en cepa MC58 naturalmente competente de *N. meningitidis*. La mezcla se colocó en una placa de agar GC, incubada durante 6 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y, a continuación, se diluyó en PBS y se esparció en placas de agar GC que contienen 5 µg / ml de eritromicina. La delección del gen *nmb1870* en las cepas MC58Δ*nmb1870*, 961 – 5945Δ*nmb1870* y M1239Δ*nmb1870* se confirmó por PCR; la falta de expresión de NMB1870 se confirmó mediante un análisis de Western blot. La delección del gen *siaD* y la falta de expresión capsular en la cepa MC58Δ*siaD* se confirmaron mediante PCR y FACS, respectivamente.

### Lipoproteínas

50 Para investigar la lipidación de NMB1870, se testó la incorporación de palmitato de la cepa BL21 (DE<sub>3</sub>) de *E. coli* recombinante que lleva la longitud completa del gen *nmb1870* tal y como se describe en la referencia 193.

55 Las cepas meningocócicas MC58 y MC58Δ*nmb1870* fueron cultivadas en un medio GC y marcadas con ácido palmítico (Amersham) [9,10<sup>3</sup> – H]. Las células del cultivo de 5 ml se lisaron por ebullición durante 10 min se centrifugaron a 13.000 rpm. Se precipitaron los sobrenadantes con TCA y se lavaron dos veces con acetona fría. Se

suspendieron las proteínas en 50 µl de SDS al 1,0 % y se analizaron 15 µl por SDS -PAGE se manchó con azul brillante de Coomassie, se fijó y se empapó durante 15 minutos en una solución de Amplify ( Amersham ). Los geles se expusieron en Hyperfilm MP ( Amersham ) a -80 °C durante tres días.

5 Se detectó en MC58 una banda radioactiva del peso molecular apropiado, pero no se detectó en el mutante *knockout* Δnmb1870. El recombinante de *E. coli* cultivado en presencia de ácido palmítico [9, 10 -<sup>3</sup> - H] - también produce una banda radiactiva en el peso molecular esperado, confirmando que la *E. coli* reconoce el motivo de lipoproteína y añade una cola lipídica a la proteína recombinante.

10 *Detección de la proteína*

Se cultivó la cepa MC58 a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub> en un medio GC en una fase estacionaria. Se recogieron muestras durante el crecimiento (OD<sub>620nm</sub> 0,05 - 0,9 ). Se cultivó MC58Δnmb1870 hasta una OD<sub>620nm</sub> de 0,5. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en varios volúmenes de PBS con el fin de estandarizar los valores de OD. El sobrenadante del cultivo se filtró usando un filtro de 0,2 µm y se precipitó 1 ml mediante la adición de 250 µl de ácido tricloroacético al 50 % (TCA). La muestra se incubó en hielo durante 2 horas, se centrifugó durante 40 min a 4 °C y se lavó el pellet con etanol helado al 70 %, y se resuspendió en PBS. 3 µl de cada muestra (que corresponde a una OD<sub>620nm</sub> de 0,03) se cargó luego en geles de poliacrilamida al 12 % y se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa.

Los análisis de *Western Blot* se realizaron según los procedimientos estándar, utilizando anticuerpos policlonales generados contra la proteína expresada en *E. coli*, a una dilución 1 : 1000 , seguida de una dilución 1 / 2000 de IgG anti - humana marcada con HPR (Sigma). La exploración se realizó utilizando un software de LabScan y un software de Imagemaster (Pharmacia).

25 Como se muestra en la Figura 3, se detectó una proteína de ~ 29,5 kDa en los extractos de células totales de *N. meningitidis*. La cantidad de proteína en el lisado celular se duplicó aproximadamente durante la curva de crecimiento, mientras que la densidad óptica del cultivo incrementó desde una OD<sub>620nm</sub> de 0,05 hasta una OD<sub>620nm</sub> de 0,9. Se detectó también una banda del mismo tamaño en el sobrenadante del cultivo. No se detectó la proteína en el sobrenadante del cultivo recientemente inoculado (OD<sub>620nm</sub> de 0,05), y se incrementó cuatro veces durante el crecimiento, de una OD<sub>620nm</sub> de 0,1 a una OD<sub>620nm</sub> de 0,9 (Figura 4, panel a la izquierda). Se confirmó la verdadera naturaleza de la expresión en el sobrenadante por pruebas de las mismas muestras de las bulas de la membrana y las proteínas citoplasmáticas. Como se muestra en el panel central de la Figura 4, la ausencia de PorA en las preparaciones de sobrenadante de PorA, se descarta una posible contaminación con las bulas de la membrana, mientras que la ausencia en el sobrenadante de la proteína citoplasmática NMB1380 confirmó que las muestras de sobrenadante no se derivan de la lisis celular (panel derecho).

La cepa *knockout* MC58Anmb1870 no muestra ninguna proteína en cualquier lisado celular o en el sobrenadante del cultivo (áreas "KO" en las Figuras 3 & 4).

40 Se detectó NMB1870 por transferencia Western en vesículas de membrana externa, confirmando que la proteína se segrega con las fracciones de la membrana de *N. meningitidis* ( Figura 5 ). Sin embargo, los sueros de ratones inmunizados con los OMVs no reconocen el NMB1870 recombinante en la transferencia Western, lo que sugiere que la proteína no es inmunogénica en las preparaciones de OMV.

45 Los análisis FACS utilizados en los anticuerpos anti - NMB 1870 confirmaron que la proteína está expuesta en la superficie y es accesible a los anticuerpos tanto en cepas de *N. meningitidis* encapsuladas y no encapsuladas (Figura 6). Los análisis FACS utilizaron una citometría de flujo de FACS -Scan, con el anticuerpo ligado detectado que utiliza un anticuerpo secundario anti - ratón (molécula completa) conjugado con FITC (Sigma). Los controles de FACS positivos utilizados en SEAM3, un mAb específico para el polisacárido capsular del meningococo B [194], el control negativo consistió en un antisero policlonal en un ratón contra la proteína citoplasmática NMB1380 [195].

50 El análisis de transferencia Western de 43 cepas mostró que el NMB1870 se expresa en todas las cepas testadas. Como se muestra en la Figura 7, no obstante, los niveles de expresión variaban considerablemente de cepa a cepa. Las cepas testadas podrían clasificarse como expresadores altos, medios y bajos:

Cepas	Alto	Medio	Bajo
ET5	9 / 9	0 / 9	0 / 9
Linaje 3	7 / 9	1 / 9	1 / 9
ET37	2 / 3	1 / 3	0 / 3
A4	0 / 4	2 / 4	2 / 4
Otro	6 / 15	7 / 15	2 / 15
<i>N. gonorrhoeae</i>	0 / 1	0 / 1	1 / 1
<i>N. cinerea</i>	0 / 1	0 / 1	1 / 1
<i>N. lactamica</i>	1 / 1	0 / 1	0 / 1
<b>Total</b>	<b>25 / 43 (58 %)</b>	<b>11 / 43 (25,5 %)</b>	<b>7 / 43 (16,5 %)</b>

La mayoría de las cepas de linajes hipervirulentos (ET - 5, linaje 3, ET - 37) expresaron altos niveles de proteína , con la excepción de A4, donde dos cepas expresaron niveles medios y dos expresaron niveles bajos. Curiosamente, la proteína se expresó a un alto nivel por cepas que se han utilizado clásicamente como las cepas de vacuna de OMV. No se encontraron patrones genéticos obvios para predecir la cantidad de proteína expresada en cada cepa. Incluso la presencia del elemento IS en la región promotora que se encontró en un 8 / 70 de las cepas (una perteneciente al serotipo A, tres del linaje 3 y cuatro de las clasificados como otros), no mostraron ninguna correlación con la expresión de la proteína .

El experimento de Western blot mostró que la diferencia en la expresión entre alto e medio, medio y bajo o alto y bajo puede ser de dos, cinco y nueve veces, respectivamente. No hay ninguna razón aparente para los diferentes niveles de expresión, y el análisis de las secuencias de ADN aguas arriba del gen no mostró ninguna característica que se correlacione con la expresión.

**15 Respuestas de los anticuerpos**

Se analizaron sueros de sujetos sanos y convalecientes para los anticuerpos anti - NMB1870 por *Western blot*. Se cargó NMB1870 purificada ( 1 µg / área ) en geles de poliacrilamida de SDS al 12,5 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La proteína unida se detectó con dilución de suero 1 / 2000, seguido de una dilución 1 / 2000 de IgG anti - humana marcado con HPR (Sigma). Mientras que sólo 2 / 10 de los sueros es de personas sanas reconocieron NMB1870, 21 / 40 de los convalecientes reconocieron la proteína, lo que lleva a la conclusión de que el NMB1870 es inmunogénico durante la infección *in vivo*. Por lo tanto, los antisueros de ratones inmunizados con NMB1870 recombinante se investigaron más a fondo.

Para preparar antisueros, se utilizaron 20 µg de proteínas recombinantes de NMB1870 de variante , variante 2 y la variante 3 para inmunizar a seis semanas de edad, los ratones hembra CD1 (Charles River). Se utilizaron entre dos y cuatro ratones por grupo. Las proteínas recombinantes se administraron por vía intraperitoneal junto con adyuvante completo de Freund (CFA) para la primera dosis y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) para la segunda (día 21) y tercera (35 días) dosis de recuerdo. Se realizó el mismo programa de inmunización utilizando adyuvante de hidróxido de aluminio (3 mg / ml) en lugar de adyuvante de Freund . Las muestras de sangre para el análisis se tomaron el día 49.

Los antisueros se testaron para determinar su capacidad para inducir la muerte mediada por el complemento de las cepas *N. meningitidis* encapsuladas, tal como se describe anteriormente [3, 196] utilizando una mezcla de suero de gazapos (Cedarlane) utilizada como fuente de complemento. El suero de un adulto sano (sin actividad bactericida intrínseca cuando se testó en una concentración final del 25 % o 50 %) también se utilizó como fuente de complemento. Los títulos bactericidas séricos se definieron como la dilución de suero que resulta en una disminución del 50 % en las unidades formadoras de colonias (CFU) por ml después de 60 minutos. La incubación de las bacterias con la mezcla de reacción en comparación con el control de CFU por ml en tiempo 0. Típicamente , las bacterias incubadas con el anticuerpo de control negativo en presencia de complemento, mostraron un incremento del 150 % al 200% en CFU / ml durante los 60 min de la incubación .

Se seleccionaron para el ensayo las cepas representativas de los expresores altos, intermedios y bajos. La expresión diferencial de la proteína en la superficie de las cepas seleccionadas se confirmó por el análisis FACS (Figura 8) del MC58, se eliminó un representante de las cepas del expresor alto con una alta eficiencia por el suero diluido hasta 1 / 64.000; NZ394/98 (originalmente NZ98/254 ), se eliminó también un representante de los expresadores intermedios con una alta eficiencia por el suero diluido hasta 1 / 16.000 e incluso la cepa 67 / 00, se eliminó un representante de las cepas del expresador bajo por el antisuero diluido hasta 1 / 2048. Las cepas de control, en el que el gen nmb1870 había sido noqueado, no se eliminó por el mismo antisuero.

Para confirmar si los sueros también fueron capaces de conferir protección *in vivo*, se testaron para demostrar si se puede inducir una protección pasiva en el modelo de rata infante. Las ratas infantes de cinco días de edad fueron pre-tratadas por vía intraperitoneal con antisueros anti - NMB1870 o con anticuerpos monoclonales anti - PorA en el tiempo 0 y se inoculó dos horas más tarde por vía intraperitoneal con 5 x 10<sup>3</sup> de CFU / rata de MenC 4243 (OAc - positivo) o MenB NZ394/98. Los hemocultivos cuantitativos se obtuvieron 24 horas después. Los recuentos bacterianos en los hemocultivos ( UFC / ml, medios geométricos) se obtuvieron mediante placas de agar sangre o chocolate. El suero del control positivo fue un anti - PorA (P1.2) para MenC y SEAM3 para MenB. Los resultados de los experimentos fueron los siguientes :

Pre - tratamiento	Cepa inoculada 4243		Cepa inoculada NZ394/98	
	Positivos	CFU / ml x 103	Positivos	CFU / ml x 103
PBS	5 / 5	450	-	-
Suero de control negativo	5 / 5	500	9 / 14	1260
Suero de control positivo	1 / 5	0,003	0 / 7	< 0,001
Anti - NMB1870	0 / 9	< 0,001	0 / 14	< 0,001



Por lo tanto no se recuperaron colonias bacterianas de la sangre de las ratas pasivamente inmunizadas con suero anti- NMB1870, mientras que la mayoría de los animales de control negativo fueron bacteriémicos.

5 **La actividad bactericida es una variante específica**

Cada tipo de variante se expresó en *E. coli* como una proteína marcada con His y se utilizó para inmunizar ratones. Se utilizaron los sueros para testar la reactividad cruzada inmunológica entre las cepas de las tres variantes por FACS y el ensayo bactericida. Como se muestra en la figura 11, mediante el análisis FACS, se reconocieron todas las cepas en cada suero, aunque el grado de reconocimiento varió considerablemente, por lo general refleja la homología del aminoácido entre las proteínas.

En un análisis más detallado, el suero anti - variante - 1 ( Figura 11, primera fila) reconoció muy bien la cepa MC58 (como se esperaba), en un grado inferior a la cepa 961 - 5945 (74,1 % de identidad) , en menor medida, la cepa M1239 ( 62,8 % de identidad). Se descubrió una tendencia similar para los antisueros frente a las variantes 2 y 3 (filas 2 y 3 de la Figura 11), aunque con el suero anti- variante - 2, las diferencias no fueron tan sorprendentes.

Un anticuerpo monoclonal contra la cápsula reconoció igualmente las tres cepas (fila 4), mientras que un suero contra la proteína citoplasmática NMBL380 utilizada como control negativo no reconoce ninguna (fila 5). Del mismo modo, los mutantes *knockout* nmb1870 no se reconocieron por ningún suero (fila 6) .

Las diferencias en inmunoreconocimiento entre las variantes fueron más evidentes por el ensayo bactericida:

Suero	MC58 (variante 1)	961 / 5945 (variante 2)	M1239 (variante 3)
Anti - variante 1	64000	256	< 4
Anti – variante 2	< 4	16000	128
Anti – variante 3	< 4	2048	16000

Los datos muestran que el suero contra cada variante fue capaz de inducir una eliminación eficiente mediada por el complemento de la cepa homóloga (títulos que oscilan entre 16.000 y 64.000), mientras que la actividad era baja (128 – 2.048 ) o ausente (< 4) contra las cepas de las otras variantes. Como se predijo a partir de la cercana homología de aminoácidos, los títulos bactericidas cruzados entre las variantes 2 y 3 fueron más altos que los otros. Cuando se utilizó el complemento humano, los títulos bactericidas de 4096, 256 y 512 se obtuvieron con las variantes 1, 2 y 3, respectivamente, utilizando las cepas de tipo homólogo. No se detectaron títulos se contra las cepas heterólogas.

**Proteínas híbridas y proteínas tándem**

Las proteínas híbridas y las proteínas en tándem pueden representarse por la fórmula: NH<sub>2</sub> - A- [ -X - L - ]<sub>n</sub> - B -

	SEC ID	A	X <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	pl
(1)	79	-	MC58 (SEC ID 80)	SEC ID 78	2996 (SEC ID 81)	6,74
(2)	82	-	MC58 (SEC ID 80)	SEC ID 144	2996 (SEC ID 81)	6,63
(3)	83	-	MC58 (SEC ID 80)	SEC ID 78	M1239 (SEC ID 84)	
(4)	85	-	MC58 (SEC ID 80)	SEC ID 144	M1239 (SEC ID 84)	
(5)	87	SEC ID 86	2996 (SEC ID 81)	SEC ID 78	M1239 (SEC ID 84)	6,44
(6)	88	SEC ID 86	2996 (SEC ID 81)	SEC ID 144	M1239 (SEC ID 84)	6,35
(7)	89	SEC ID 86	M1239 (SEC ID 84)	SEC ID 78	2996 (SEC ID 81)	
(8)	90	SEC ID 86	M1239 (SEC ID 84)	SEC ID 144	2996 (SEC ID 81)	
(9)	91	Cys	“936” (SEC ID 76)	SEC ID 78	2996 (SEC ID 81)	
(10)	92	Cys	“936” (SEC ID 76)	SEC ID 144	2996 (SEC ID 81)	
(11)	93	Cys	“936” (SEC ID 76)	SEC ID 78	M1239 (SEC ID 84)	
(12)	94	Cys	“936” (SEC ID 76)	SEC ID 144	M1239 (SEC ID 84)	

COOH. Se construyeron genes que codifican diversas proteínas de este tipo, donde n = 2 , los N -terminales de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se eliminan hasta el extremo de sus regiones de poli -glicina, y - L<sub>2</sub> - y - B - están ausentes (u otro B es una etiqueta de poli - histidina utilizada para la purificación). La siguiente tabla muestra los componentes de estas proteínas en sus formas maduras, y da la SEC ID N<sup>os</sup> del polipéptido completo, la SEC ID N<sup>os</sup> y cepas para las secuencias de los componentes A, X<sub>1</sub>, L<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>:

De estos doce proteínas, por lo tanto, ocho son proteínas NMB1870 en tándem (MW ~ 55 kDa) y cuatro son proteínas híbridas con '936<sub>2996</sub>' en el extremo N -terminal (MW ~ 49 kDa). Se utilizaron dos enlazadores: ( a) la SEQ ID N° 78 , que se deriva del homólogo NMB1870 gonocócico (SEC ID N° 46) y (b) un enlazador rico en glicina (SEQ ID N° 144). Se utilizó también la SEC ID N° 78 en el extremo N -terminal de las proteínas maduras, sin sus dos

residuos BamH1 N -terminal (Gly-Ser) es decir; la SEQ ID N° 86.

5 Las doce proteínas eran solubles cuando se expresaron en *E. coli* y, tras de la purificación, se utilizaron para inmunizar a los ratones. Las respuestas de los anticuerpos bactericidas en suero (SBA) se evaluaron con cuatro cepas de meningococo, asegurando una de cada una de las tres variantes NMB1870 1 a 3 (mostrado como superíndices). El adyuvante fue bien un CFA (arriba) bien un hidróxido de aluminio (abajo):

Proteína	SBA			
	2996 <sup>(2)</sup>	MC58 <sup>(1)</sup>	M1239 <sup>(3)</sup>	961/5945 <sup>(2)</sup>
(1)	4096	262144	2048	32768
	1024	32768	128	2048
(2)	8192	262144	2048	32768
	1024	16384	512	1024
(3)	—	131072	32768	4096
	—	32768	4096	1024
(4)	—	262144	32768	8192
	—	32768	1024	512
(5)	512	<4	4096	32768
	1024	16	4096	8192
(6)	4096	<4	32768	32768
	2048	16	4096	16384
(7)	—	4	4096	32768
	—	16	4096	8192
(8)	2048	32	32768	32768
	1024	32	8192	16384
(9)	2048	<4	<4	32768
	4096	<4	512	16384
(10)	4096	<4	256	131072
	512	<4	<4	2048
(11)	256	<4	>32768	2048
	4	4	4096	128
(12)	2048	<4	>32768	4096
	16	256	4096	256

10 Estos resultados muestran claramente la naturaleza variante - específica de las reacciones inmunes. Por ejemplo, las proteínas (1) y (2) incluyen secuencias de variantes 1 y 2 NMB1870, y los mejores resultados de SBA se ven contra de estas dos variantes. Del mismo modo, los mejores resultados se ven frente a las variantes 1 y 3 cuando se utilizan las proteínas (3) y (4). La buena actividad se ve utilizando NMB1870 a partir de las variantes 2 y 3, en cualquier orden a partir del N -terminal a C -terminal, utilizando proteínas (5) a (8), con poca actividad contra la variante 1. La naturaleza de la variante específica de la respuesta NMB1870 es también evidente cuando se utiliza las proteínas híbridas, con alguna actividad anti - 2996 siendo proporcionada por la parte '936'.

15 Se utilizan los siguientes oligonucleótidos durante la construcción de las 12 proteínas:

Proteína	Cebador SEC ID N°S (Fwd & Rev)	Zonas de restricción
(1)	95 & 96	<i>Bam</i> HI & <i>X</i> hoI
(2)	97 & 98	<i>Bam</i> HI & <i>X</i> hoI
(3)	99 & 100	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(4)	101 & 102	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(5)	103 & 104	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(6)	105 & 106	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(7)	107 & 108	<i>Bam</i> HI & <i>X</i> hoI
(8)	109 & 110	<i>Bam</i> HI & <i>X</i> hoI
(9)	111 & 112	<i>Bam</i> HI & <i>X</i> hoI
(10)	113 & 114	<i>Bam</i> HI & <i>X</i> hoI
(11)	115 & 116	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(12)	117 & 118	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
NMB1870 <sub>M1239</sub>	119 & 120	<i>Nde</i> I & <i>Bam</i> HI
NMB1870 <sub>2996</sub>	121 & 122	<i>Nde</i> I & <i>Bam</i> HI

**Proteína de tándem triple**

Una proteína "de tándem triple ", en la que n = 3, se construye a partir de cepas (1) MC58, (2), 2996 y (3) m1239. La proteína de triple tándem 757mer NH<sub>2</sub> – A – X<sub>1</sub> – L<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - L<sub>2</sub> – X<sub>3</sub> - L<sub>3</sub> - B - COOH tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 142:

Parte	A	X <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	L <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	L <sub>3</sub>	B
Elemento	-	NBM1870 <sub>MC58</sub>	Enlazador rico en gly	NBM1870 <sub>2996</sub>	Enlazador rico en gly	NBM1870 <sub>m1239</sub>	-	-
SEC ID	-	80	144	81	144	84	-	-
Variante	-	1	-	2	-	3	-	-

Tanto X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> les falta el extremo N – Terminal hasta sus regiones poli - glicina ( es decir; son secuencias ΔG).

**Títulos de SBA bactericida**

Se inmunizaron ratones con nueve proteínas diferentes y se testó la actividad bactericida de los sueros resultantes contra diversas cepas de meningococo, incluyendo las dos cepas que coinciden con las proteínas inmunizantes que se derivaron y las cepas que son diferentes de las proteínas inmunizantes. Las proteínas fueron nueve:

(A), (B) y (C) proteínas híbridas de 936 y NMB1870

(A) NMB1870<sub>MC58</sub> = variante 1 [12]

(B) NMB1870<sub>2996</sub> = variante 2, por ejemplo, SECs ID N°: 91 y & 92

(C) NMB1870<sub>M1239</sub> = variante 3 por ejemplo, SECs ID N°: 91 y & 92

(D), (E) & (F) NMB1870 a partir de cepas individuales

(D) NMB1870<sub>MC58</sub> = variante 1, por ejemplo, SEC ID N° 80

(E) NMB1870<sub>2996</sub> = variante 2, por ejemplo SEC ID N° 81

(F) NMB1870<sub>M1239</sub> = variante 3, por ejemplo SEC ID N° 84

(G), (H) & (I) NMB1870 proteínas en tándem

(G) NMB1870<sub>MC58</sub> - NMB1870<sub>2996</sub> = variantes 1 & 2 por ejemplo, SECs ID N° 79 & 82

(H) NMB1870<sub>2996</sub> - NMB1870<sub>M1239</sub> = variantes 2 & 3, por ejemplo SECs ID N° 87 & 88

(I) NMB1870<sub>MC58</sub> - NMB1870<sub>M1239</sub> = variantes 1 & 3 por ejemplo, SECs ID N° 83 & 85

Las respuestas bactericidas se midieron contra un máximo de 20 cepas que poseen la variante 1 del NMB1870, contra un máximo de 22 cepas con la variante 2 de NMB1870 y contra 5 cepas con la variante 3.

La eficacia bactericida del suero producido contra las proteínas de (A) a (C) coincidió con el genotipo de las cepas de prueba, por ejemplo, utilizando CFA como adyuvante para las inmunizaciones, los títulos de los SBA contra la cepa MC58 ( variante 1) fueron: (A) 262144; (B) < 4; (C) < 4. Del mismo modo, cuando los sueros se testaron contra la cepa 961 – 5945 (variante 2) la SBA fue: (A) 256, (B) 32768; (C) 4096. Por último , frente a la cepa M1239 (variante 3) los títulos fueron: (A) < 4; (B) 512, (C) 32768.

## ES 2 436 747 T5

5 Utilizando CFA o hidróxido de aluminio como adyuvante, la proteína (A) dio títulos SBA de  $\geq 512$  contra las siguientes cepas: M01 - 240185, M2197, LPN17592, M6190, (todo el ET37), MC58, BZ83, CU385, N44/89, 44/ 76, M2934, M4215 (todo el ET5); BZ133; M1390, ISS1026, ISS1126, ISS1102( lin.3; F6124 (s111) y M2937 otro). Estas cepas cubren los serotipos A, B, C y W135; no se testaron la cepas del serotipo Y.

10 Utilizando CFA o hidróxido de aluminio como adyuvante, la proteína (B) dio títulos de SBA  $\geq 512$  contra las cepas: 2996, 961-5945, 96217 (grupo A4); M01 - 240013, C11, NGH38, M3279, M4287, BZ232 (otro). Estas cepas cubren los serotipos B y C; se testaron las cepas W135 o Y; no se testó el serotipo A.

10 Utilizando CFA o hidróxido de aluminio como adyuvante, la proteína (C) dio títulos de SBA  $\geq 512$  contra las cepas: M01 - 0240364, NGPI65 (ET37), M1239 ( lin. 3); M01 - 240355, M3369 (otro). Estas cepas están en el serotipo B, se testaron las cepas W135 o Y; no se testó el serotipo A.

15 Los patrones de SBA visto con las proteínas (A) a (C), se observó también con proteínas (D) a (F). Contra la cepa MC58, se obtuvo suero utilizando la proteína (D) y el adyuvante de hidróxido de aluminio dio un título de SBA  $< 4$  16384, mientras que se obtuvo suero utilizando la proteína (B) o (F) y el mismo adyuvante dio títulos de SBA  $< 4$ .  
Contra la cepa 961-5945, el suero de proteína (D) y (F) dio títulos inferiores a aquellos obtenidos utilizando (E).  
Contra la cepa M1239, los títulos de SBA fueron: (D)  $< 4$ ; (E) 128; (F) 16384.

20 Con las proteínas en tándem, se amplió la eficacia de SBA. Los sueros obtenidos utilizando la proteína (G) fueron bactericidas contra la cepa MC58 y 961 - 5945, así como otras cepas que poseen la variante 1 o la variante 2 de NMB1870. Se incrementó el suero contra la proteína (H) que dio títulos bajos frente a las cepas que poseen variante 1 de NMB1870, pero los títulos altos contra otras cepas, por ejemplo, 16384 contra la cepa 961 - 5945 (variante 2) y 32768 contra la cepa M3369 (variante 3).

30 El suero obtenido por la inmunización con proteína adyuvante CFA (H) dio títulos de SBA  $\geq 512$  contra: LNP17094, 96217, 961-5945, 299 , 5/99 (grupo A4), C4678, M01 - 0240364, NGP165 (ET37), M1239 (lin. 3), M2552, BZ232, M3279, M4287, 1000, NGH38, C1 , M01 - 240013, M01 - 240355, M3369 (otro). Estas cepas cubren los serotipos B y C; la actividad contra los serotipos A, y no se testaron las cepas W135 o Y con proteína (H).

35 El suero obtenido por la inmunización con proteína adyuvante CFA (I) dio títulos de SBA  $\geq 512$  contra: M01 - 0240364, 14784, M6190, MC58, LPN17592, M2197 (ET37), 44 /76 (ET5); M1239, 1SS1102, 1SS1106, 1SS1026, 394 /98 (lin. 3), M2937 (otro). Estas cepas cubren los serotipos B, C y W135; y no se testó la actividad contra las cepas de los serotipos A o Y con proteínas (I).

Tras la inmunización con proteínas que contienen la variante 1 del NMB1870, se testaron los sueros contra un 20 cepas que tienen un NMB1870 en la variante 1 que dio títulos de SBA de la siguiente manera:

Proteína	(A)	(A)	(D)	(D)	(G)	(G)	(I)	(I)
Adyuvante	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
Nº de cepas testadas	18	20	20	20	13	13	11	11
SBA $< 128$	1	7	4	3	0	5	0	2
SBA 128 – 512	2	4	0	4	0	3	0	3
SBA $> 512$	15	9	16	13	13	5	11	6

40 Tras la inmunización con proteínas que contienen la variante 2 de NM1870, se testaron sueros contra 22 cepas que tienen un NMB1870 en la variante 2 que dio títulos de SBA de la siguiente manera:

Proteína	(B)	(B)	(E)	(G)	(G)	(H)	(H)	(I)	(I)
Adyuvante	CFA	Alum	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
Nº de cepas testadas	16	19	22	16	15	22	22	7	6
SBA $< 128$	6	14	13	6	10	7	8	3	5
SBA 128 – 512	0	2	7	3	3	1	6	0	1
SBA $> 512$	10	3	2	7	2	14	8	4	0

45 Tras la inmunización con proteínas que contienen la variante 3 de NMB1870, se testaron sueros contra 5 cepas que tienen un NMB1870 en la variante 3 que dio títulos de SBA de la siguiente manera:

Proteína	(C)	(C)	(F)	(G)	(G)	(H)	(H)	(I)	(I)
Adyuvante	CFA	Alum	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
Nº de cepas testadas	5	5	5	5	5	5	5	3	3
SBA $< 128$	0	1	1	1	1	0	0	1	1
SBA 128 – 512	0	0	0	0	2	0	0	0	1
SBA $> 512$	5	4	4	4	2	5	5	2	1

**Conclusiones**

- Al principio, el NMB1870 no parece ser un antígeno útil para la amplia inmunización - sus niveles de expresión varían entre las cepas, hay una variabilidad de secuencia significativa, y no hay protección cruzada entre las diferentes variantes. Sin embargo, se ha demostrado que incluso las cepas que expresan niveles muy bajos de este antígeno son susceptibles a los sueros anti - NMB1870. Además, la diversidad de secuencias se limita a tres formas de variantes, tales que una amplia inmunidad puede lograrse sin necesidad de un gran número de antígenos. Además, parece que estas tres proteínas pueden ofrecer más inmunidad que el meningococo del serotipo B.
- Las diferentes variantes de NMB1870 pueden expresarse juntas como proteínas de fusión con el fin de proporcionar cadenas de polipéptidos individuales, que son activos contra más de una variante.
- El NMB1870 es inmunogénico durante la infección, es capaz de inducir anticuerpos bactericidas, y protege a las ratas infantas de la exposición a las bacterias .
- Se puede encontrar en la referencia 197 más información experimental sobre el NMB1870.
- Se entenderá que la invención sólo se ha descrito a modo de ejemplo y pueden hacerse modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

**BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO SECUENCIAL**

SEC ID Nº:	Descripción
1 – 23	23 secuencias diferentes de NMB1870, longitud completa
24 – 45	22 secuencias diferentes de NMB1870, con cisteínas en extremo N - terminal
46	Secuencia de aminoácidos en el extremo N – terminal utilizada para la expresión
47 – 66	Cebadores en PCR
67 – 69	Secuencias parciales de la Figura 1
70 – 73 & 86	Motivos de secuencia para la retención u omisión de las proteínas de la invención
74 – 75	Caja Fur
76	“936” de MC58 con péptido líder procesado
77	Ejemplo de un híbrido 936 <sub>MC58</sub> – ΔG – NMB1870 <sub>M1239</sub>
78	Secuencia derivada de gonocócico utilizado para la expresión quimérica
79, 82, 83, 85, 87, 88, 89, 90	Proteínas en tándem NMB1870
80, 81, 84	Secuencias truncadas NMB1870
91 – 94	Proteínas híbridas de “936” y NMB1870
95 – 122	Cebadores en PCR
123 – 141	Secuencias de longitud completa NMB1870
142	Secuencia de tándem triple NMB1870
143	Secuencia Haji NadA
144	Enlazador de glicina

**REFERENCIAS**

- [1] Jodar et al., (2002) Lancet 359(9316) : 1499 – 1508.
- [2] Tettelin et al., (2000) Science 287 : 1809 – 1815.
- [3] Pizza et al., (2000) Science 287 : 1816 – 1820.
- [4] Parkhill et al., (2000) Nature 404 : 502 – 506.
- [5] <http://dnal.chem.ou.edu/gono.html>
- [6] W099/24578.
- [7] W099/36544.
- [8] WO99/57280.
- [9] WO00/22430.
- [10] WO01/64920.
- [11] WOO 1/64922.
- [12] WO03/020756.
- [13] WO03/063766.
- [14] Achtman (1995) *Global epidemiology of meningococcal disease*. Páginas 159 – 175 de *Meningococcal disease* (ed. Cartwright). ISBN: 0 – 471 – 95259 – 1.
- [15] Caugant (1998) APMIS 106 : 505 – 525.
- [16] Maiden et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 3140 – 3145.
- [17] Reilly & Smith (1999) Protein Expr Purif 17 : 401 – 409.
- [18] Covacci & Rappuoli (2000) J. Exp. Med. 19 : 587 – 592.
- [19] WO93/18150.

- [20] Covacci et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5791 – 5795.  
 [21] Tummuru et al., (1994) Infect. Immun. 61 : 1799 – 1809.  
 [22] Marchetti et al., (1998) Vaccine 16 : 33 – 37.  
 [23] Telford et al., (1994) J. Exp. Med. 179 : 1653 – 1658.  
 5 [24] Evans et al., (1995) Gene 153 : 123 – 127.  
 [25] WO96/01272 y WO96/01273, especialmente la SEC ID N° 6.  
 [26] W097/25429.  
 [27] WO98/04702.  
 [28] Costantino et al., (1992) Vaccine 10 : 691 – 698.  
 10 [29] Costantino et al., (1999) Vaccine 17 : 1251 – 1263.  
 [30] Solicitud de patente internacional WO03/007985.  
 [31] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19 : 331 – 332.  
 [32] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47 : 269 – 285, v.  
 [33] Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65 : 187 – 207.  
 15 [34] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19 : 1187 – 1188.  
 [35] Iwarson (1995) APMIS 103 : 321 – 326.  
 [36] Gerlich et al., (1990) Vaccine 8 Suppl: S63 – 68 y 79 – 80.  
 [37] Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0 – 7216 – 1946 – 0.  
 [38] Del Giudice et al., (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19 : 1 – 70.  
 20 [39] Gustafsson et al., (1996) N. Engl. J. Med. 334 : 349 – 355.  
 [40] Rappuoli et al., (1991) TIBTECH 9 : 232 – 238.  
 [41] Hsu et al., (1999) Clin Liver Dis 3 : 901 – 915.  
 [42] WO02/079243.  
 [43] Solicitud de patente internacional WO02/02606.  
 25 [44] Kalman et al., (1999) Nature Genetics 21 : 385 – 389.  
 [45] Read et al., (2000) Nucleic Acids Res 28 : 1397 – 406.  
 [46] Shirai et al., (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3) : S524 – S527.  
 [47] Solicitud de patente internacional WO99/27105.  
 [48] Solicitud de patente internacional WO00/27994.  
 30 [49] Solicitud de patente internacional WO00/37494.  
 [50] Solicitud de patente internacional W099/28475.  
 [51] Ross et al., (2001) Vaccine 19 : 4135 – 4142.  
 [52] Sutler et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47 : 287 – 308.  
 [53] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59 : 113 – 118, 125 – 126.  
 35 [54] Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl : S2 – 6.  
 [55] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16; 47(1) : 12, 19.  
 [56] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101 – 107.  
 [57] Schuchat (1999) Lancet 353 (9146) : 51 – 6.  
 [58] Solicitud de patente internacional WO02/34771.  
 40 [59] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13 : 227 – 43, viii.  
 [60] Ferretti et al., (2001) PNAS USA 98 : 4658 – 4663.  
 [61] Kuroda et al., (2001) Lancet 357 (9264) : 1225 – 1240; véanse también las páginas 1218 – 1219.  
 [62] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39 : 85 – 100.  
 [63] Demicheli et al., (1998) Vaccine 16 : 880 – 884.  
 45 [64] Stepanov et al., (1996) J Biotechnol 44 : 155 – 160.  
 [65] Ingram (2001) Trends Neurosci 24 : 305 – 307.  
 [66] Rosenberg (2001) Nature 411 : 380 – 384.  
 [67] Moingeon (2001) Vaccine 19 : 1305 – 1326.  
 [68] EP – A – 0372501  
 50 [69] EP – A – 0378881  
 [70] EP – A – 0427347  
 [71] W093/17712  
 [72] WO94/03208  
 [73] W098/58668  
 55 [74] EP – A – 0471177  
 [75] WO00/56360  
 [76] WO91/01146  
 [77] WO00/61761  
 [78] WO01/72337  
 60 [79] Research Disclosure, 453077 (Enero 2002)  
 [80] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2 : 47 – 49.  
 [81] Ravenscroft et al., (1999) Vaccine 17 : 2802 – 2816.  
 [82] Solicitud de patente internacional WO03/080678.  
 [83] Nilsson & Svensson (1979) Carbohydrate Research 69 : 292 – 296).  
 65 [84] Frash (1990) p.123 – 145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)  
 [85] Inzana (1987) Infect. Immun. 55 : 1573 – 1579.

- [86] Kandil et al., (1997) *Glycoconj J* 14 : 13 – 17.  
 [87] Berkin et al., (2002) *Chemistry* 8 : 4424 – 4433.  
 [88] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2 : S28 – 36.  
 [89] Buttery & Moxon (2000) *JR Coll Physicians Lond* 34 : 163 – 168.  
 5 [90] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13 : 113 – 33, vii.  
 [91] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47 : 563 – 567.  
 [92] Patente Europea 0477508.  
 [93] Patente US 5,306,492.  
 [94] W098/42721.  
 10 [95] Dick et al., en *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.,) Karger, Basel, 1989, 10 : 48 – 114.  
 [96] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.  
 [97] Kanra et al., (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42 : 421 – 427.  
 [98] Ravenscroft et al., (2000) *Dev Biol (Basel)* 103 : 35 – 47.  
 [99] WO97/00697.  
 15 [100] WO02/00249.  
 [101] Zielen et al., (2000) *Infect. Immun.* 68 : 1435 – 1440.  
 [102] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4 : 609 – 630.  
 [103] Tettelin et al., (2001) *Science* 293 : 498 – 506.  
 [104] Hoskins et al., (2001) *J Bacteriol* 183 : 5709 – 5717.  
 20 [105] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3 : 445 – 450  
 [106] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19 : 2688 – 2691.  
 [107] Masignani et al., (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2 : 895 – 905.  
 [108] Mora et al., (2003) *Drug Discov Today* 8 : 459 – 464.  
 [109] Wizemann et al., (2001) *Infect Immun* 69 : 1593 – 1598.  
 25 [110] Rigden et al., (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38 : 143 – 168.  
 [112] Ramsay et al., (2001) *Lancet* 357 (9251) : 195 – 196.  
 [113] Anderson (1983) *Infect Immun* 39 (1) : 233 – 238.  
 [114] Anderson et al., (1985) *J Clin Invest* 76 (1) : 52 – 59.  
 [115] Falugi et al., (2001) *Eur J Immunol* 31 : 3816 – 3824.  
 30 [116] EP – A – 0594610.  
 [117] WO02/091998.  
 [118] WO99/42130  
 [119] WO96/40242  
 [120] Lees et al., (1996) *Vaccine* 14 : 190 – 198.  
 35 [121] WO95/08348.  
 [122] Patente US 4,882,317  
 [123] Patente US 4,695,624  
 [124] Porro et al., (1985) *Mol Immunol* 22 : 907 – 919.s  
 [125] EP – A – 0208375  
 40 [126] WO00/10599  
 [127] Gever et al., *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171 – 288 (1979).  
 [128] Patente US 4,057,685.  
 [129] Patentes US 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.  
 [130] Patente US 4,459,286.  
 45 [131] Patente US 4,965,338  
 [132] Patente US 4,663,160.  
 [133] Patente US 4,761,283  
 [134] Patente US 4,356,170  
 [135] Lei et al., (2000) *Dev Biol (Basel)* 103 : 259 – 264.  
 50 [136] WO00/38711; Patente US 6,146,902.  
 [137] WO02/09643.  
 [138] Katial et al., (2002) *Infect Immun* 70 : 702 – 707.  
 [139] WO01/52885.  
 [140] Patente Europea 0301992.  
 55 [141] Bjune et al., (1991) *Lancet* 338 (8775) : 1093 – 1096.  
 [142] Fukasawa et al., (1999) *Vaccine* 17 : 2951 – 2958.  
 [143] WO02/09746.  
 [144] Rosenqvist et al., (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92 : 323 – 333.  
 [145] WO01/09350.  
 60 [146] Patente Europea 0449958.  
 [147] EP – A – 0996712.  
 [148] EP – A – 0680512.  
 [149] WO02/062378.  
 [150] W099/59625.  
 65 [151] Patente US 6,180,111.  
 [152] WO01/34642.

- [153] WO03/051379.  
 [154] Patente US 6,558,677  
 [155] PCT/IB03/04293.  
 [156] WO02/062380.  
 5 [157] WO00/25811.  
 [158] Peeters et al., (1996) *Vaccine* 14 : 1008 – 1015.  
 [159] Vermont et al., (2003) *Infect Immun* 71 : 1650 – 1655.  
 [160] WO01/30390.  
 [161] Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.  
 10 [162] WO03/009869.  
 [163] *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0 – 306 – 44867 – X).  
 [164] WO90/14837.  
 [165] WO02/26212.  
 15 [166] WO98/33487.  
 [167] WO00/07621.  
 [168] WO99/27960.  
 [169] WO98/57659.  
 [170] Solicitudes de patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231.  
 20 [171] Krieg (2000) *Vaccine* 19 : 618 – 622; Krieg (2001) *Curr opin Mol Ther* 2001 3 : 15 – 24; WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581, etc.  
 [172] WO99/52549.  
 [173] WO01/21207.  
 [174] WO01/21152.  
 25 [175] WO00/62800.  
 [176] WO00/23105.  
 [177] WO99/11241.  
 [178] de Lorenzo et al., (1987) *J. Bacteriol.* 169 : 2624 – 2630.  
 [179] Nakai & Kanehisa (1991) *Proteins* 11 : 95 – 110.  
 30 [180] Yamaguchi et al., (1988) *Cell* 53 : 423 – 432.  
 [181] <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>  
 [182] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>  
 [183] Strutzberg et al., (1995) *Infect. Immun.* 63 : 3846 – 3850.  
 [184] Legrain et al., (1993) *Gene* 130 : 73 – 80.  
 35 [185] Loosmore et al., (1996) *Mol Microbiol* 19 : 575 – 586.  
 [186] Myers et al., (1998) *Infect. Immun.* 66 : 4183 – 4192.  
 [187] Schlegel et al., (2002) *J. Bacteriol.* 184 : 3069 – 3077.  
 [188] Turner et al., (2002) *Infect. Immun.* 70 : 4447 – 4461.  
 [189] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/micr.html>  
 40 [190] Voulhoux et al., *Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference*. NIPH, Oslo, página 31.  
 [191] Comanducci et al., (2002) *J. Exp. Med.* 195 : 1445 – 1454.  
 [192] WO03/010194.  
 [193] Jennings et al., (2002) *Eur. J. Biochem.* 269 : 3722 – 3731.  
 [194] Granoff et al., (1998) *J. Immunol.* 160 : 5028 – 5036.  
 45 [195] Grifantini et al., (2002) *Nat. Biotechnol.* 20 : 914 – 921.  
 [196] Peeters et al., (1999) *Vaccine* 17: 2702 – 2712.  
 [197] Masignani et al., (2003) *J Exp Med* 197 : 789 – 799.



**LISTADO SECUENCIAL**

5 *SEC ID N° 1 - cepa M58 [WO / 57280]*  
 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
 AKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

10 *SEC ID N° 2 - cepa gb185*  
 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

15 *SEC ID N° 3 - cepa m4030*  
 MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

20 *SEC ID N° 4 - cepa iss1001*  
 MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSGKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

25 *SEC ID N° 5 - cepa Inp592*  
 MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDK  
 VSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLYT  
 TIDFAVKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

30 *SEC ID N° 6 - cepa f6124*  
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGKLYTTIDFA  
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDKRRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

35 *SEC ID N° 7 - cepa m198171*  
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGKLYTTIDFA  
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDKRRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

40 *SEC ID N° 8 - cepa m2197*  
 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

45 *SEC ID N° 9 - cepa m2937*  
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLRSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDLEHSGKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
 AKQYGGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

50 *SEC ID N° 10 - cepa 961 - 5945*  
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA  
 KQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIIEKVVHEIGIAGKQ

55 *SEC ID N° 11 - cepa gb083*  
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA  
 KQGHGKIEHLKTPQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIIEKVVHEIGIAGKQ

60 *SEC ID N° 11 - cepa gb083*  
 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA  
 KQGHGKIEHLKTPQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIIEKVVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 12 - cepa 860800

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK  
KQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

5

SEC ID N° 13 - cepa 95n477

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK  
KQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

10

SEC ID N° 14 - cepa m2671

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK  
KQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

15

SEC ID N° 15 - cepa 1000

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK  
KQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

20

SEC ID N° 16 - cepa m3279

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK  
KQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

25

SEC ID N° 17 - cepa 193 - 4286

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK  
KQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

30

SEC ID N° 18 - cepa ml 239

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLN  
NDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDPNGLR  
HYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQONVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

35

SEC ID N° 19 - cepa 16889

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLN  
NDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDAGGKL  
TYTIDFAAQGHGKIEHLKTPQONVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEISIAGKQ

40

SEC ID N° 20 - cepa gb355

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLN  
NDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDAGGKL  
TYTIDFAAQGHGKIEHLKTPQONVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

45

SEC ID N° 21 - cepa m3813

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGIAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLN  
KISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDAGGKLT  
TIDFAAQGHGKIEHLKTPQONVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

50

SEC ID N° 22 - cepa ngp165

MNRTTFCCSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGGKDNSLNTGKLN  
NDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDPNGLR  
HYTIDFTNKQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

55

SEC ID N° 23 - cepa fa1090

MNRTTFCCSLTAGPDSRLQRRGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEASIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGGKDNSLNTGKLN  
KISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVALRIEINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDADGKLT  
TIDFAAQGHGKIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYRLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIADKQ

60

65

SEC ID N° 24 - cepa MC58

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVD  
LAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVRTVNGIRHIGLAAKQ

5

SEC ID N° 25 - cepa gb185

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGKLTITLESGEF  
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVE  
LATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHIGLAAKQ

10

SEC ID N° 26 - cepa m4030

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVE  
LATAYIKPDEKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHIGLAAKQ

15

SEC ID N° 27 - cepa iss1001

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSGKMVAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVE  
LATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHIGLAAKQ

20

SEC ID N° 28 - cepa lnp17592

CSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL  
ESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAVQGHGKIEHLKSP  
ELNVDLAAAYIKPDKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHIGLAAKQ

25

SEC ID N° 29 - cepa f6124

CSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVD  
LAASDIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEGSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

30

SEC ID N° 30 - cepa m198172

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVD  
LAASDIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEGSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

35

SEC ID N° 31 - cepa m2197

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVD  
LAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEGSYSLSGIFGGQAQEVAGSAEVRTVNGIRHIGLAAKQ

40

SEC ID N° 32 - cepa m2937

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLRSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QVYKQSHSALTALQTEQEQDLEHSGKMVAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPREGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGYGKIEHLKSPELNVD  
LAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLSGIFGGEAQEVAGSAEVRTANGIHIGLAAKQ

45

SEC ID N° 33 - cepa 961 - 5945

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPQNVEL  
AAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

50

SEC ID N° 34 - cepa gb013

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQQGHGKIEHLKTPQNVEL  
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

55

SEC ID N° 35 - cepa 860800

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL  
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

60

65

SEC ID N° 36 - cepa 95n477

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
 QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL  
 ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

5

SEC ID N° 37 - cepa m2176

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF  
 QIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL  
 ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

10

SEC ID N° 38 - cepa 1000

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEF  
 QIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL  
 ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

15

SEC ID N° 39 - cepa m3279

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEF  
 QIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL  
 ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

20

SEC ID N° 40 - cepa 193 - 4286

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEF  
 QIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVEL  
 ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

25

SEC ID N° 41 - cepa m1239

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQT  
 ITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLK  
 TLEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

30

SEC ID N° 42 - cepa 16889

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQT  
 ITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLK  
 TPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEISIAAGKQ

35

SEC ID N° 43 - cepa gb355

CSSGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQT  
 ITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLK  
 TPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

40

SEC ID N° 44 - cepa 3813

CSSGGGSGGIAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTIT  
 LASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP  
 EQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

45

SEC ID N° 45 - cepa ngp165

CSSGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQAQAEKTFKAGGKDNLSNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQT  
 ITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLHYSIDFTNKQGYGRIEHLK  
 TPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

50

SEC ID N° 46 - cepa secuencia de extremo N - terminal para expresión

GPDSRLQRRG

55

SEC ID N° 47 - cebador en PCR

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

60

SEC ID N° 48 - cebador en PCR

CCCGCTCGAGTTGCTTGGCGGCAAGGC

SEC ID N° 49 - cebador en PCR

CGCGGATCCCATATGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

65

SEC ID N° 50 - cebador en PCR

**CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC**

SEC ID N° 51 - cebador en PCR

**CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGGAGGGGTGGTGTCCG**

SEC ID N° 52 - cebador en PCR

**GCCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC**

SEC ID N° 53 - cebador en PCR

**CGCGGATCCCATATGAATCGAAGTGCCTTCTGTGCGC**

SEC ID N° 54 - cebador en PCR

**CCCGCTCGAGTTATTGCTTGGCGGCAAGGC**

SEC ID N° 55 - cebador en PCR

**GACCTGCCTCATTGATG**

SEC ID N° 56 - cebador en PCR

**CGGTAATTATCGTGTTCGGACGGC**

SEC ID N° 57 - cebador en PCR

**CAAATCGAAGTGGACGGGCAG**

SEC ID N° 58 - cebador en PCR

**TGTTGATTTTGCCGTTTCCTG**

SEC ID N° 59 - cebador en PCR

**GCTCTAGACCAGCCAGGCGCATAC**

SEC ID N° 60 - cebador en PCR

**TCCCCCGGGGACGGCATTGTTTACAGG**

SEC ID N° 61 - cebador en PCR

**TCCCCCGGGCGCCAAGCAATAACCATTG**

SEC ID N° 62 - cebador en PCR

**CCCGCTCGAGCAGCGTATCGAACCATGC**

SEC ID N° 63 - cebador en PCR

**GCTCTAGATTCTTTCCAAGAACTCTC**

SEC ID N° 64 - cebador en PCR

**TCCCCCGGGCCCGTATCATCCACCAC**

SEC ID N° 65 - cebador en PCR

**TCCCCCGGGATCCACGCAATACCCC**

SEC ID N° 66 - cebador en PCR

**CCCGCTCGAGATATAAGTGAAGACGGA**

SEC ID N° 67 - Secuencia de la Figura 1

**LNQIVK**

SEC ID N° 68 - Secuencia de la Figura 1

**VNRTAFCCLSLTTALILTAC**

SEC ID N° 69 - Secuencia de la Figura 1

**AATTGAACCAAATCGTCAAATAACAGGTTGCCTGTAACAAAATGCCGCTGAACCGCCGTTCCGGACGACATTTGATTTTTGCTTCTTTGACCTGC  
CTCATTGATGCGGTATGCAAAAAAGATACCATAACCAAAATGTTATATATTATCTATTCTGCGTATGACTAGGAGTAAACCTGTGAATCGAACT  
GCCTTCTGCTGCCCTTCTCTGACCACTGCCCTGATTCTGACCGCCTGC**

SEC ID N° 70 - Secuencia que puede omitirse

**TRSKP**

SEC ID N° 71 - Secuencia que puede omitirse

**TRSKPV**

SEC ID N° 72 - Secuencia que puede omitirse

**PSEPPFG**

SEC ID N° 73 - Secuencia que puede omitirse

**GGGG**

SEC ID N° 74 - Caja fur supuesta en MenB

**CATAACCAAATGTTATA**

SEC ID N° 75 - Caja fur consenso de E. coli

**GATAATGATAATCATTATC**

SEC ID N° 76 - "936" de MC58 con péptido líder procesado

**VSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDNVMALRIETTARSYLQRNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYI  
TVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQR**

SEC ID N° 77 - Ejemplo de proteína híbrida

**MVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDNVMALRIETTARSYLQRNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYI  
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGVAAIDG  
TGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQITTLASGEFQIYKQNSAV  
VALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAAEKKADEK  
SHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**

SEC ID N° 78 - Secuencia para expresión

**GSGPDSRLQQR**

SEC ID N° 79 - NMB1870 en tandem (MC58 & 2996)

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH  
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK  
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRLQQRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSL  
TLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFL  
VSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALF  
GDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**

SEC ID N° 80 - NBM1870MC58 con borrado en el extremo N - terminal ΔG

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH  
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK  
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ**

SEC ID N° 81 NBM18702996 con borrado en el extremo N - terminal ΔG

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDH  
SAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKA  
DEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**

SEC ID N° 82 - NMB1870 en tandem (MC58 & 2996)

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH  
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK  
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVR  
KNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGG  
HTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEI  
AGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**

SEC ID N° 83 - NBM1870 en tadem (MC58 - M1229)

**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLKAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH  
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK  
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRLQQRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL  
TLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQITTLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQR**

SFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 84 - NBM1870MC58 con borrado en el extremo N - terminal ΔG

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 85 - NBM1870 en tandem (MC58 & M1239)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRTYRGTAFGSSDAGGKLYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 86 - Secuencia para expresión

GPDSRLQQR

SEC ID N° 87 - NBM1870 (2996 & M1239)

GPDSRLQQRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRLQQRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 88 - NBM1870 en tandem (2996 & M1239)

GPDSRLQQRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRLQQRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 89 - NBM1870 en tandem (M1239 & 2996)

GPDSRLQQRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRLQQRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 90 - NBM1870 en tandem (M1239 & 2996)

GPDSRLQQRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHSYIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRLQQRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 91 - Híbrido de la proteína " 936" y NBM18702996

CVSAVIGSAVGAASAVDRRTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLGQVATEGEKQFVQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKIVITLYQNYVQRGSGPDSRLQQRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDVQKIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGHEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQKQHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 92 - Híbrido de proteína "936" y NMB18702996

CVSAVIGSAAVGA~~S~~AVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYL~~R~~QNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLGGVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVYNY  
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGI SPATQARVKIVTYGNVTVVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGVAADIG  
AGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVR~~K~~NEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS~~A~~VVAL  
QIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP~~E~~QNV~~L~~AAAAELKADEKSHA  
VILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

5

SEC ID N° 92 - Híbrido de proteína "936" y NMB1870M1239

CVSAVIGSAAVGA~~S~~AVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYL~~R~~QNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLGGVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVYNY  
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGI SPATQARVKIVTYGNVTVVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGPDS~~R~~LQOR  
RVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQITLASGEFQIY  
KQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPN~~G~~RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTL~~E~~QNV~~L~~AAAA  
ELKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

10

15

SEC ID N° 93 - Híbrido de proteína "936" y NMB1870M1239

CVSAVIGSAAVGA~~S~~AVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYL~~R~~QNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLGGVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVYNY  
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGI SPATQARVKIVTYGNVTVVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGVAADIG  
TGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQITLASGEFQIYKQNHSAV  
VALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPN~~G~~RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTL~~E~~QNV~~L~~AAAAELKADEK  
SHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

20

25

SEC ID N° 94 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 95 - cebador de oligonucleótidos

CCCGCTCGAGCTGTTTCCCGCGATGCC

30

SEC ID N° 96 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTCC

SEC ID N° 97 - cebador de oligonucleótidos

CCCGCTCGAGCTGTTTCCCGCGATGCC

35

SEC ID N° 98 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 99 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTCCCGCGATGCC

40

SEC ID N° 100 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTCC

SEC ID N° 101 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTCCCGCGATGCC

45

SEC ID N° 102 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 103 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTCCCGCGATGCC

50

SEC ID N° 104 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTCC

SEC ID N° 105 - cebador de oligonucleótidos

CCCAAGCTTCTGTTTCCCGCGATGCC

55

SEC ID N° 106 - cebador de oligonucleótidos

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 107 - cebador de oligonucleótidos

CCCGCTCGAGCTGTTTCCCGCGATGCC

60

65



SEC ID N° 109 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

5 SEC ID N° 110 - cebador de oligonucleótidos  
CCCCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 111 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

10 SEC ID N° 112 - cebador de oligonucleótidos  
CCCCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 113 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

15 SEC ID N° 114 - cebador de oligonucleótidos  
CCCCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 115 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 116 - cebador de oligonucleótidos  
CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

20 SEC ID N° 117 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

SEC ID N° 118 - cebador de oligonucleótidos  
CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

30 SEC ID N° 119 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 120 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCCTGTTTGCCGGCGATGCC

35 SEC ID N° 121 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCG

SEC ID N° 122 - cebador de oligonucleótidos  
CGCGGATCCCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEC ID N° 123 - cepa FN131217

45 MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPQGRATYRGTAFGSDDASGKLYTTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSLNVDLAASDIKPKKRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

SEC ID N° 124 - cepa ES14933

50 MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSALTALQTEQEQDPEHSGKMKVAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

SEC ID N° 125 - cepa GB0993

55 MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPENVELAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIQHIGLAAKQ

SEC ID N° 126 - cepa M6190

60 MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVNGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSRKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGD SATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
AKQGYGKIEHLKSPENVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

65

SEC ID N° 127 - cepa F19324

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEC ID N° 128 - cepa ISS1113

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGKLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEC ID N° 129 - cepa gb0345

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGKLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEC ID N° 130 - cepa M0445

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIQHIGLAAKQ

SEC ID N° 131 - cepa MK82

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPVDKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 132 - cepa 8047

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 133 - cepa C4678

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 134 - cepa ISS1133

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 135 - cepa GN6 / 88

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 136 - cepa M0579

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 137 - cepa F16325

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK  
KQGYGRIEHLKTPQONVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 138 - cepa gb988

MNRTTFCCSLTAALILTACSSGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNLNTGKLNKDKVSRFD  
NOKISRFDFVQKIEVDGQITLLESGEFQYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGDCAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK  
HYTIDFTNKQGYGRIEHLKTPELNVDLASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEC ID N° 139 - cepa 2201731

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGKA

5

SEC ID N° 140 - cepa gb101

MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQAERTFKAGDKNSLNTGKLNK  
NDKISRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGK  
LYTIDFAAQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEANGIRHIGLAAKQ

10

SEC ID N° 141 - cepa mge31

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGTGLAYALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR  
FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDF  
TKKQGYGRIEHLKTPQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

15

SEC ID N° 142 - Tandem NMB1870 triple (MC58, 2996 y m1239)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH  
SALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIK  
PDGKRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTNNGIRHIGLAAKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVR  
KNEKLLAAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGE  
HTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQGHGKIEHLKTPQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEI  
AGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQAERTFKAGDKNSLNTGKLNKDKI  
SRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSI  
DFTKKQGYGRIEHLKTEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

20

25

SEC ID N° 143 - cepas NadA de Haji

MKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVNTLTKT  
VNENKQNVDAKVAEAEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNI VKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDET  
NTKADEAVKTANEAKQTAETKQNVDAKVAEAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKONI AKKANSADVYTREESDSKFVRI  
DGLNATTEKLDTRLASAEXSITEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTA AVGGYKSES AVAIGTGFRFTENFAAKG  
VAVGTSSGSSAAYHVGVNYEW

30

35

SEC ID N° 144 - enlazador de glicina

GSGGGG

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunogénica de dos proteínas que comprende (a) una sal de aluminio adyuvante; (b) una primera proteína que comprende una secuencia aminoácida que tiene, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a SEC ID N° 24 y (c) una segunda proteína, que comprende una secuencia aminoácida que tiene, al menos, un 85 % de identidad de secuencia respecto a SEC ID N° 33; en la que la proteína (b) tiene menos del 70 % de identidad de secuencia respecto a la proteína (c).
2. La composición según la reivindicación 1, en la que la composición puede obtener una respuesta anticuerpo bactericida contra cepas de *N. meningitidis* en, al menos, 2 líneas hipervirulentas ET – 37, ET – 5, grupo A4, línea 3, subtipo I, subtipo III y subtipo IV – 1.
3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la primera proteína tiene, al menos, un 88 % de identidad respecto a la SEC ID N° 24.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la segunda proteína tiene, al menos, un 88 % de identidad respecto a la SEC ID N° 33.
5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha primera y / o segunda proteína(s) es / son proteínas meningocócicas.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que una o más de las proteínas es una lipoproteína.
7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que, al menos, una de las proteínas no incluye la secuencia aminoácida TKSKP (SEC ID N° 70) o TRSKPV (SEC ID N° 71) en los 10 aminoácidos de sus extremos N – Terminal.
8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que, al menos, una de las proteínas no incluye la secuencia aminoácida PSEPPFG (SEC ID N° 72) en los 10 aminoácidos de sus extremos N – Terminal.
9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que, al menos, una de las proteínas incluye la secuencia aminoácida GGGG (SEC ID N° 73).
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que, al menos, una de las proteínas se utiliza en forma de proteína de fusión.
11. La composición según la reivindicación 10, en la que la proteína de fusión incluye la SEC ID N° 46 y / o la secuencia de lipoproteína líder P4 de *H. influenzae*.
12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una o más proteínas que contienen una secuencia aminoácida seleccionada de SECs ID N° 1 a 45 y 77.
13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno de Neisserial diferente a la proteína NMB1870.
14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo una vesícula preparada a partir de *N. meningitidis*.
15. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno sacárido de los serotipo A, C, W135 y / o Y de *N. meningitidis*.
16. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno sacárido de los serotipo A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.
17. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B.
18. La composición según las reivindicaciones 15 a 17, en la que el / los antígeno(s) sacárido(s) son oligosacáridos.
19. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae*.
20. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es estéril.

21. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es tamponada a un pH de entre 6 y 8.
- 5 22. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, incluyendo un hidróxido de aluminio adyuvante o un fosfato de aluminio adyuvante.
23. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su utilización como un medicamento.
- 10 24. La utilización de una primera proteína y de una segunda proteína como se define en la reivindicación 1, y una sal de aluminio adyuvante, en la fabricación de un medicamento para prevenir la infección por Neisserial en un mamífero.
- 15 25. La composición según la reivindicación 23, o la utilización de la reivindicación 24, en la que el medicamento es administrado a un paciente por inyección parenteral.
- 20 26. La composición o la utilización según la reivindicación 25, en la que el medicamento se administra intramuscularmente.

FIGURA 1

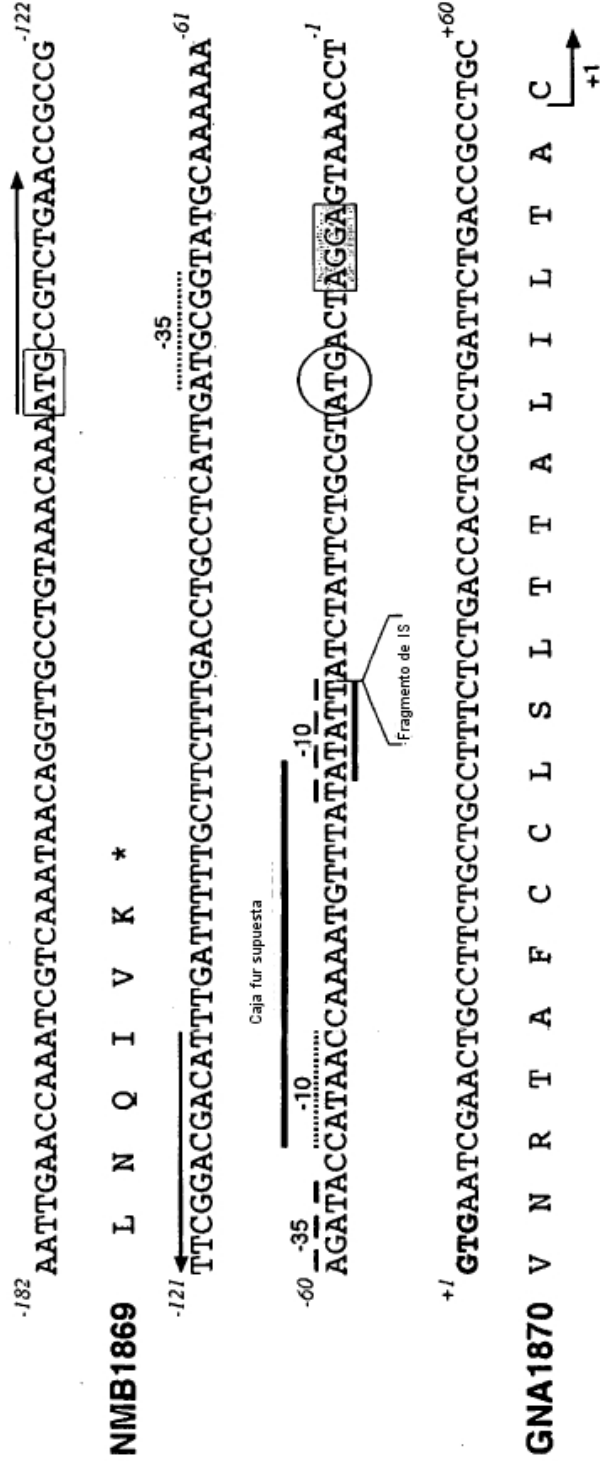
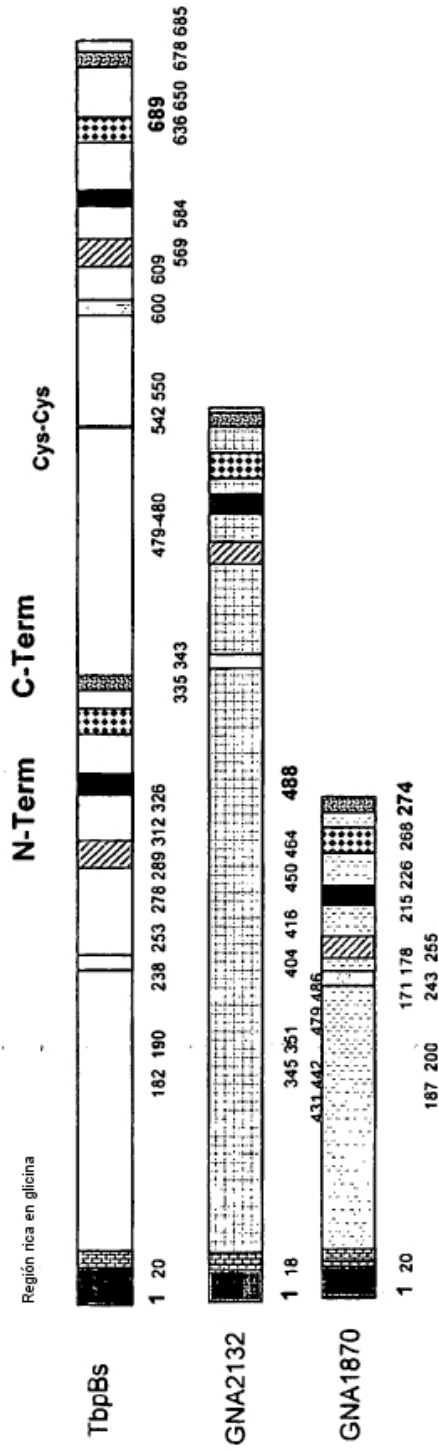
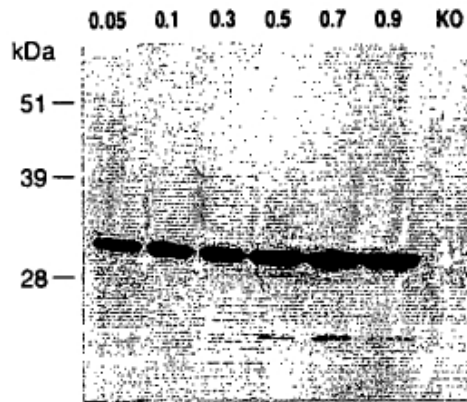


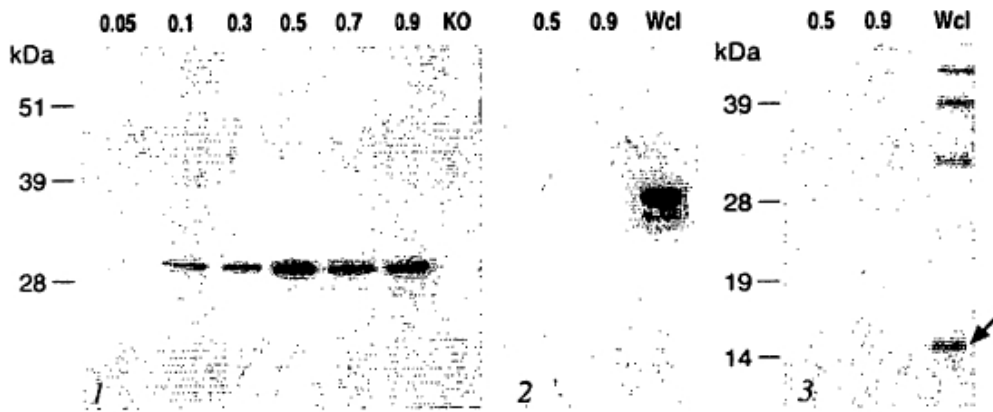
Figura 2



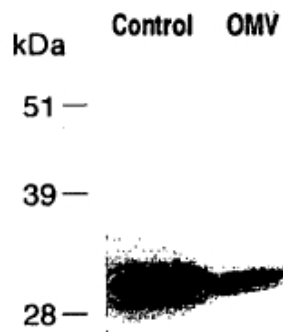
**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

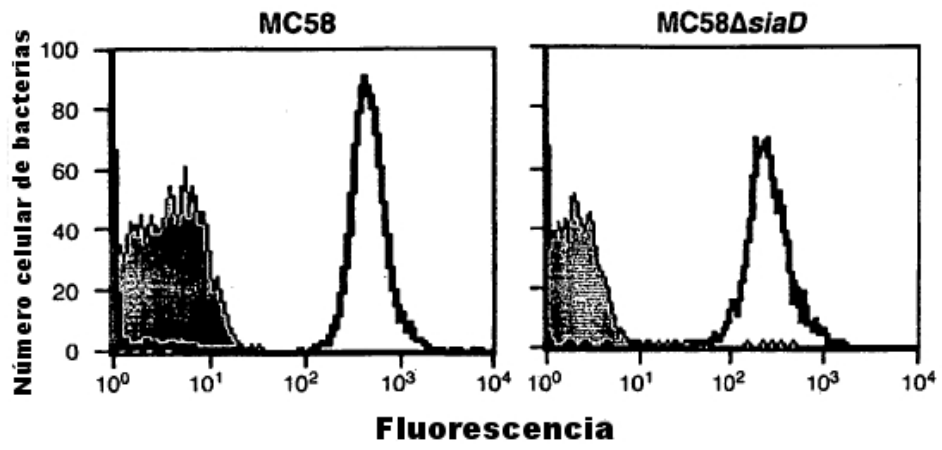


**FIGURA 5**

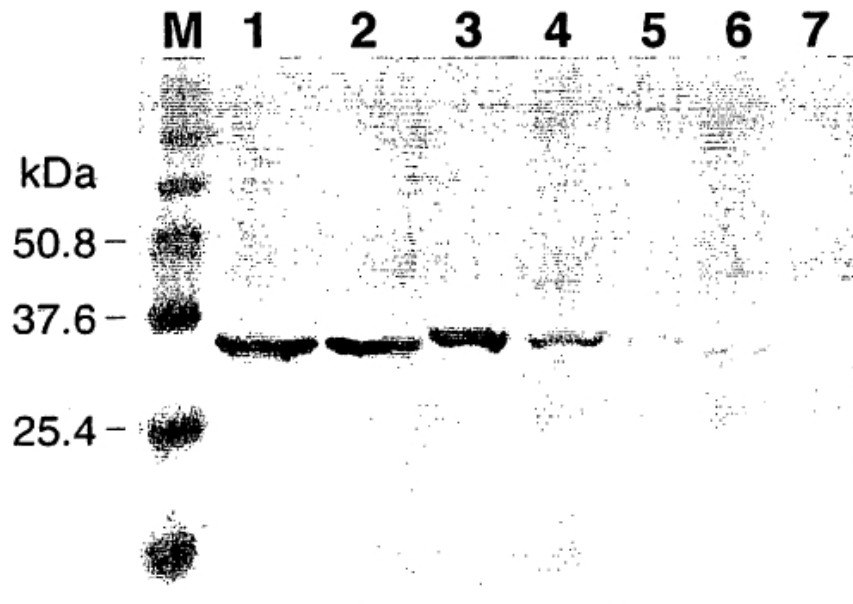




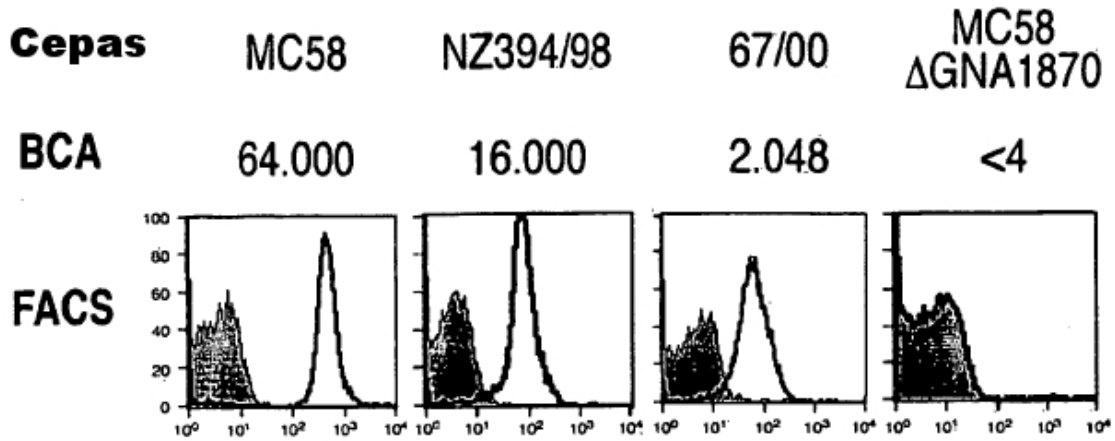
**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**



**FIGURA 9**

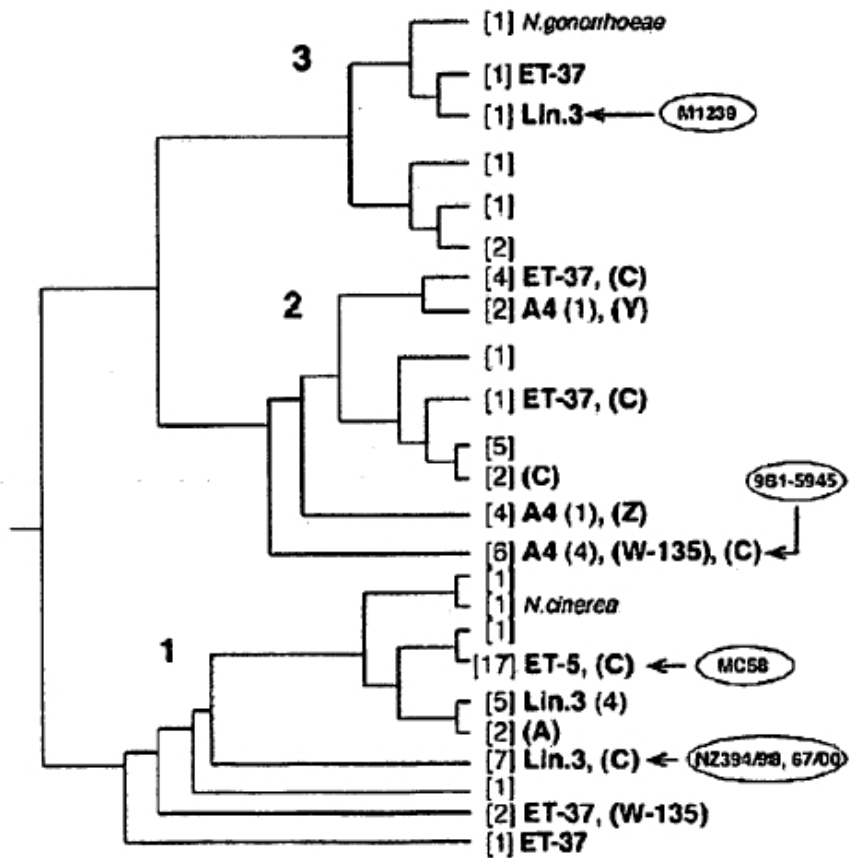


FIGURA 10

1

**tipo 1** -19: VNR<sup>1</sup>TAFCCLSL<sup>2</sup>TALIL<sup>3</sup>TACS<sup>4</sup>.....SGGGGVAADIGAGLADALTAPLDH: 26  
**tipo 2** -19: VNR<sup>1</sup>TAFCCLSL<sup>2</sup>TALIL<sup>3</sup>TACS<sup>4</sup>.....SGGGGVAADIGAGLADALTAPLDH: 26  
**tipo 3** -19: VNR<sup>1</sup>TAFCCLSL<sup>2</sup>TALIL<sup>3</sup>TACS<sup>4</sup>SSGGGSSGGGVAADIG<sup>5</sup>TGLADALTAPLDH: 31

**tipo 1** 27: KDKGLQSL<sup>1</sup>TL<sup>2</sup>DQSVR<sup>3</sup>KNEK<sup>4</sup>LKLA<sup>5</sup>AQGA<sup>6</sup>EKT<sup>7</sup>YNGD<sup>8</sup>...SLNTGK<sup>9</sup>LKND<sup>10</sup>KV: 73  
**tipo 2** 27: KDKSLQSL<sup>1</sup>TL<sup>2</sup>DQSVR<sup>3</sup>KNEK<sup>4</sup>LKLA<sup>5</sup>AQGA<sup>6</sup>EKT<sup>7</sup>YNGD<sup>8</sup>...SLNTGK<sup>9</sup>LKND<sup>10</sup>KV: 73  
**tipo 3** 32: KDKGLKSL<sup>1</sup>TL<sup>2</sup>ED<sup>3</sup>SI<sup>4</sup>PONG<sup>5</sup>TL<sup>6</sup>LS<sup>7</sup>AQGA<sup>8</sup>EKT<sup>9</sup>PKAG<sup>10</sup>KD<sup>11</sup>NSLNTGK<sup>12</sup>LKND<sup>13</sup>KV: 81

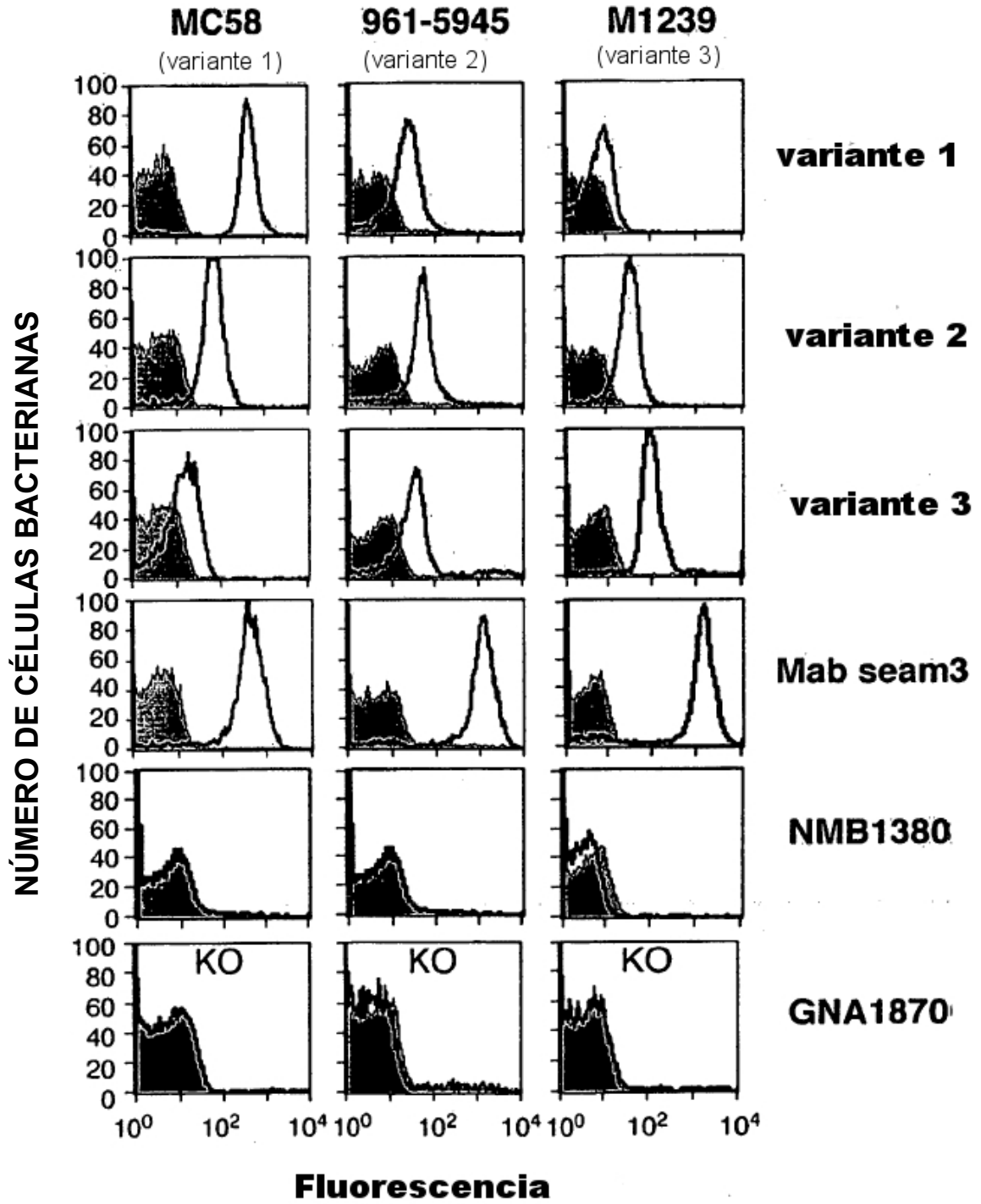
**tipo 1** 74: SRFD<sup>1</sup>FIRQ<sup>2</sup>IEVD<sup>3</sup>GQLIT<sup>4</sup>LES<sup>5</sup>GEFQ<sup>6</sup>YK<sup>7</sup>QSH<sup>8</sup>SALT<sup>9</sup>AFQ<sup>10</sup>TEQ<sup>11</sup>IQD<sup>12</sup>SEHS<sup>13</sup>GKM: 123  
**tipo 2** 74: SRFD<sup>1</sup>FIRQ<sup>2</sup>IEVD<sup>3</sup>GQLIT<sup>4</sup>LES<sup>5</sup>GEFQ<sup>6</sup>YK<sup>7</sup>QSH<sup>8</sup>SAV<sup>9</sup>VALQ<sup>10</sup>IEK<sup>11</sup>IN<sup>12</sup>PN<sup>13</sup>DK<sup>14</sup>IDS<sup>15</sup>L: 123  
**tipo 3** 82: SRFD<sup>1</sup>FV<sup>2</sup>QK<sup>3</sup>IEVD<sup>4</sup>GQ<sup>5</sup>TIT<sup>6</sup>LAS<sup>7</sup>GEFQ<sup>8</sup>YK<sup>9</sup>QSH<sup>10</sup>SAV<sup>11</sup>VALQ<sup>12</sup>IEK<sup>13</sup>IN<sup>14</sup>PN<sup>15</sup>DK<sup>16</sup>IDS<sup>17</sup>L: 131

**tipo 1** 124: VAK<sup>1</sup>RF<sup>2</sup>FR<sup>3</sup>IG<sup>4</sup>DI<sup>5</sup>AGE<sup>6</sup>HT<sup>7</sup>S<sup>8</sup>FD<sup>9</sup>KL<sup>10</sup>PE<sup>11</sup>CCR<sup>12</sup>AT<sup>13</sup>Y<sup>14</sup>RC<sup>15</sup>TAF<sup>16</sup>GSD<sup>17</sup>DAG<sup>18</sup>GK<sup>19</sup>LY<sup>20</sup>TT<sup>21</sup>ID<sup>22</sup>FA: 173  
**tipo 2** 124: IN<sup>1</sup>QRS<sup>2</sup>FLV<sup>3</sup>SGL<sup>4</sup>GG<sup>5</sup>EH<sup>6</sup>TAF<sup>7</sup>NQ<sup>8</sup>LP<sup>9</sup>.DCK<sup>10</sup>AE<sup>11</sup>Y<sup>12</sup>HG<sup>13</sup>KAF<sup>14</sup>SS<sup>15</sup>DDAG<sup>16</sup>GK<sup>17</sup>LY<sup>18</sup>TT<sup>19</sup>ID<sup>20</sup>FA: 172  
**tipo 3** 132: IN<sup>1</sup>QRS<sup>2</sup>FLV<sup>3</sup>SGL<sup>4</sup>GG<sup>5</sup>EH<sup>6</sup>TAF<sup>7</sup>NQ<sup>8</sup>LP<sup>9</sup>.GCK<sup>10</sup>AE<sup>11</sup>Y<sup>12</sup>HG<sup>13</sup>KAF<sup>14</sup>SS<sup>15</sup>DDPN<sup>16</sup>GR<sup>17</sup>LY<sup>18</sup>SS<sup>19</sup>ID<sup>20</sup>FT: 180

**tipo 1** 174: AKQ<sup>1</sup>GNG<sup>2</sup>KIE<sup>3</sup>HLK<sup>4</sup>SPE<sup>5</sup>LN<sup>6</sup>VD<sup>7</sup>LAA<sup>8</sup>AD<sup>9</sup>DK<sup>10</sup>PD<sup>11</sup>GK<sup>12</sup>RH<sup>13</sup>AV<sup>14</sup>IS<sup>15</sup>GS<sup>16</sup>VLY<sup>17</sup>NQ<sup>18</sup>AE<sup>19</sup>KGS<sup>20</sup>YS: 223  
**tipo 2** 173: AKQ<sup>1</sup>GHG<sup>2</sup>KIE<sup>3</sup>HLK<sup>4</sup>TPE<sup>5</sup>Q<sup>6</sup>N<sup>7</sup>VELAA<sup>8</sup>AE<sup>9</sup>LKA<sup>10</sup>DEK<sup>11</sup>SH<sup>12</sup>AV<sup>13</sup>ILG<sup>14</sup>DTRY<sup>15</sup>GSEE<sup>16</sup>KG<sup>17</sup>TY<sup>18</sup>H: 222  
**tipo 3** 181: KKQ<sup>1</sup>GYGR<sup>2</sup>IE<sup>3</sup>HLK<sup>4</sup>TLE<sup>5</sup>Q<sup>6</sup>N<sup>7</sup>VELAA<sup>8</sup>AE<sup>9</sup>LKA<sup>10</sup>DEK<sup>11</sup>SH<sup>12</sup>AV<sup>13</sup>ILG<sup>14</sup>DTRY<sup>15</sup>GSEE<sup>16</sup>KG<sup>17</sup>TY<sup>18</sup>H: 230

**tipo 1** 224: LG<sup>1</sup>IFG<sup>2</sup>GKA<sup>3</sup>QEV<sup>4</sup>AGS<sup>5</sup>AE<sup>6</sup>VKT<sup>7</sup>VNG<sup>8</sup>IR<sup>9</sup>HI<sup>10</sup>GI<sup>11</sup>AKQ: 255  
**tipo 2** 223: LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ: 254  
**tipo 3** 231: LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ: 262

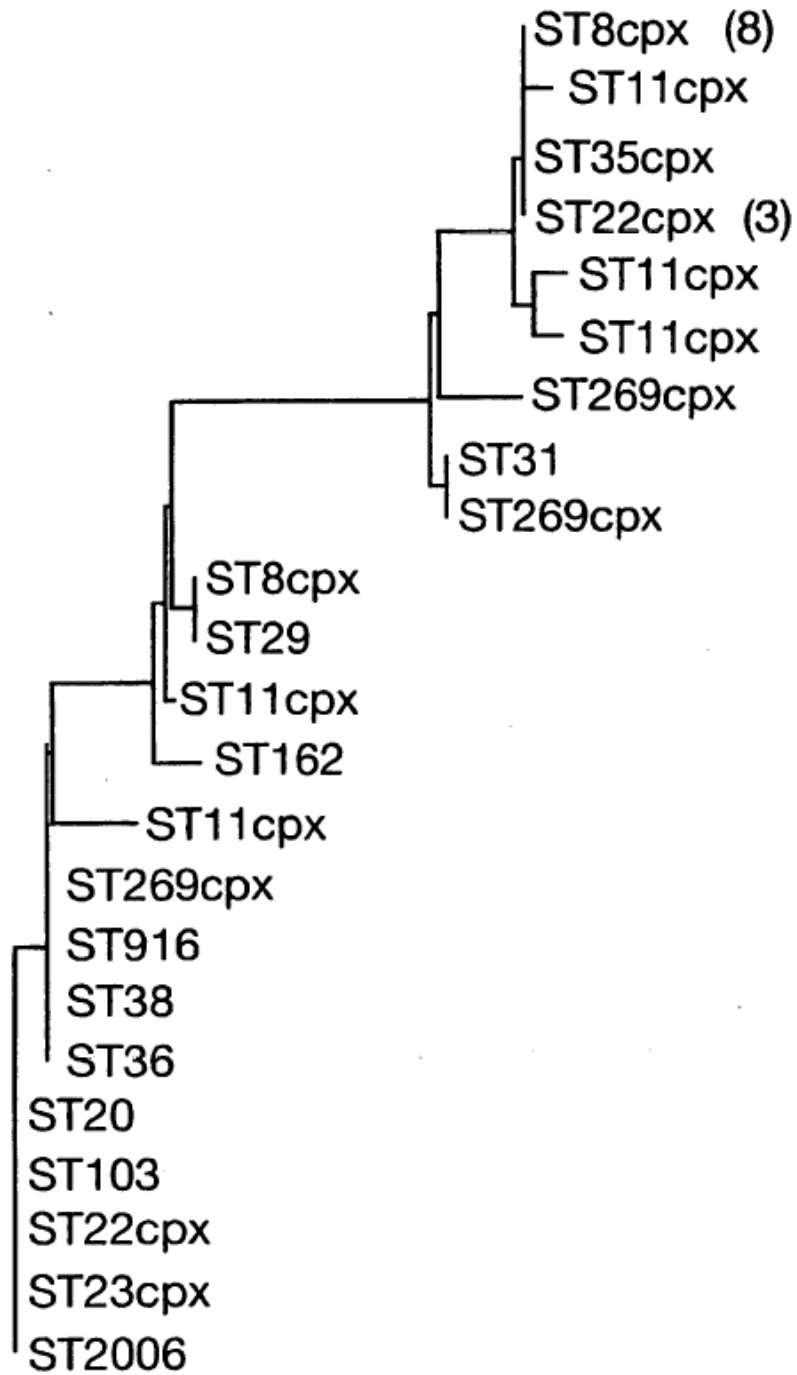
**FIGURA 11**



**FIGURA 12**



**FIGURA 13**



**FIGURA 14**

