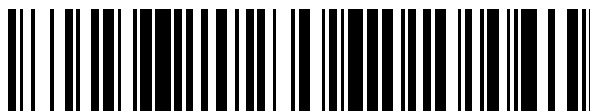


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 569**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2011** **PCT/US2011/030400**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011** **WO11126863**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2011** **E 11766478 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2552942**

54 Título: **Proteínas de unión al factor H (fHbp) con propiedades alteradas y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

07.02.2011 US 440227 P

16.12.2010 US 423757 P

08.09.2010 US 381025 P

13.05.2010 US 334542 P

30.03.2010 US 319181 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER
AT OAKLAND (100.0%)
747 52nd Street
Oakland, CA 94609, US**

72 Inventor/es:

**BEERNINK, PETER T.;
GRANOFF, DAN M. y
PAJON FEYT, ROLANDO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 661 569 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión al factor H (fHbp) con propiedades alteradas y métodos de uso de las mismas

5 Declaración relativa a la investigación patrocinada a nivel federal

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno en virtud de las subvenciones n.º R01 AI 046464, R01 AI 082263 y AI 070955 otorgadas por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención.

10 Introducción

Neisseria meningitidis es una bacteria Gram-negativa que coloniza el tracto respiratorio superior humano y es responsable de brotes epidémicos esporádicos y cíclicos en todo el mundo, principalmente, de meningitis y sepsis. Las tasas de ataque y morbilidad más elevadas se dan en los niños menores de 2 años. Al igual que otras bacterias Gram-negativas, normalmente, *Neisseria meningitidis* posee una membrana citoplasmática, una capa de peptidoglicano, una membrana externa que, junto con el polisacárido capsular, constituyen la pared bacteriana, y pili, que se proyectan hacia el ambiente exterior. Las cepas encapsuladas de *Neisseria meningitidis* son una causa principal de meningitis bacteriana y septicemia en niños y adultos jóvenes. La frecuencia e importancia económica de las infecciones por *Neisseria meningitidis* invasoras han impulsado la búsqueda de vacunas eficaces que puedan conferir inmunidad hacia diferentes cepas, y, en particular, hacia cepas del grupo B genéticamente diversas con diferentes serotipos o serosubtipos.

La proteína de unión al factor H (fHbp, también denominada en la técnica lipoproteína 2086 (Fletcher *et al.*, (2004) 72:2088-2100), el antígeno de *Neisseria* derivado del genoma (GNA) 1870 (Masignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-99) o "741"), es una proteína de *N. meningitidis* que se expresa en la bacteria en forma de una lipoproteína expuesta a la superficie. Una función importante de fHbp es unir el factor H del complemento humano (fH), que regula por disminución la activación del complemento. La unión a fH a la superficie bacteriana es un mecanismo importante mediante el que el patógeno sobrevive en suero o sangre humana no inmune y evade las defensas innatas del hospedador. Recientemente, se encontró que la variación genética en el grupo de genes del factor humano H afecta a la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad meningocócica (Davila S *et al.*, (2010) *Nat Genetics* doi:10.1038/ng.640). La unión a fH a fHbp es específica del fH humano y podría explicar por qué *Neisseria meningitidis* es estrictamente un patógeno humano.

Sigue existiendo la necesidad de un polipéptido fHbp que pueda generar respuestas de anticuerpos bactericidas eficaces.

Sumario

Se proporcionan proteínas de unión al factor H que pueden generar anticuerpos que son bactericidas para al menos una cepa de *N. meningitidis*, y métodos de uso de dichas proteínas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Panel A, curva patrón de la concentración de fH humano medida por ELISA con fHbp meningocócica como antígeno en los pocillos. Véase el Ejemplo 1 para más detalles. Panel B, concentraciones de fH humano en sueros de ratones transgénicos (Tg) para fH humano, que abarca compañeros de camada negativos en fH humano de ratones Tg o ratones BALB/c de tipo silvestre conocidos, y las concentraciones de fH humano en el suero de seres humanos. Véase el Ejemplo 1.

Figura 2. Respuestas de anticuerpos IgG en suero de ratones BALB/c transgénicos para fH humano (fH Tg) y ratones BALB/c de tipo silvestre (WT) inmunizados con una vacuna de control de conjugado meningocócico del grupo C (Paneles A y B) y títulos bactericidas en suero contra la cepa 4243 del grupo C (Panel C). La vacuna de conjugado no se une a fH humano. Véase el Ejemplo 1 para más detalles. Panel D. El fH humano se une a la vacuna de fHbp de tipo silvestre, pero no se une a la vacuna de conjugado de MenC-CRM de control ni a ciertas vacunas de fHbp mutante, que se muestra esquemáticamente para acompañar a la Tabla 5 en el apartado de ejemplos. El fH de ratón (o conejo, o rata, etc.) no se une a la fHbp de tipo silvestre.

Figura 3. Relaciones entre las concentraciones de fH humano en suero de ratones transgénicos para fH y las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero a la vacunación con fHbp de tipo silvestre que se une a fH humano (panel A) o a la vacunación con mutante R41S que no contiene fH humano (panel B). El panel C muestra las proporciones de GMT (vacuna mutante/tipo silvestre en relación con las concentraciones de fH humano en suero de ratones transgénicos para fH inmunizados) estimadas a partir del modelo de regresión lineal general. Véase el Ejemplo 4 para más detalles.

Figura 4. Unión a fH humano, y anticuerpos monoclonales anti-fHbp, JAR 4 y JAR 5, por fHbp de tipo silvestre y mutantes (mutantes de fHbp ID1 que contienen sustituciones de Glu a Ala), medido mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Figura 5. Tamaño de SDS-PAGE y análisis de pureza de fHbp WT ID 1 y un doble mutante de ID 1,

E218A/E239A. Las masas moleculares en kDa se indican a la izquierda.

Figura 6. Inhibición de fHbp soluble de la unión del anticuerpo monoclonal anti-fHbp a fHbp de tipo silvestre inmovilizada mediante ELISA.

Figura 7. Los paneles A y B representan la calorimetría de barrido diferencial de fHbp ID 1 de tipo silvestre y proteína doble mutante E218A/E239A (panel A) y de fHbp ID 1 de tipo silvestre y proteína mutante R41S (panel B). El panel C representa títulos de anticuerpos IgG anti-fHbp de ratones inmunizados con fHbp ID 1 de tipo silvestre o proteína doble mutante E218A/E239A determinados mediante ELISA. Respuestas de anticuerpos IgG anti-fHbp de ratones inmunizados con fHbp WT o fHbp mutante. En el Estudio 3, se inmunizaron los ratones con tres dosis de fHbp WT recombinante o fHbp mutante adsorbida con Adyuvante de Freund (FA) o hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$); en el Estudio 4, se inmunizaron ratones CD-1 con una dosis de fHbp WT o fHbp mutante adsorbida con hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$); en el Estudio 5, se inmunizaron ratones BALB/c con tres dosis de WT o fHbp mutante adsorbido con hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$). Barras sombreadas, fHbp WT; barras sin sombrear, fHbp mutante E218A/E239A. El panel D representa títulos de IgG anti-fHbp de ratones BALB/c a quienes se administraron dos dosis de vacuna de fHbp en el Estudio 6.

Figura 8. El panel A representa la unión a fH a las variantes naturales de fHbp. Los pocillos de las placas de microtitulación se recubrieron con fHbp recombinantes que representan las variantes de fHbp con ID 1, 14 o 15. La unión a fH humano se midió como se describe en el apartado de Ejemplos. Los paneles B y C representan la unión de las variantes de fHbp ID 1, 14 y 15 a los anticuerpos monoclonales JAR4 y JAR5, respectivamente.

Figura 9. Panel A, Estructura del complejo entre fHbp y un fragmento de fH humano. fHbp se muestra en la parte inferior en negro, con el fH mostrado en la parte superior en gris en la representación de dibujos animados. Modelo estructural de fHbp unido a un fragmento de fH basado en las coordenadas atómicas publicadas (Schneider *et al.* ((2009) *Nature* 458:890-3)). Las cintas negras representan los respectivos dominios N- y C-terminales de la molécula fHbp. La cinta gris representa el sexto y séptimo dominios cortos de repetición de consenso de fH humano que se han mostrado previamente que median en la interacción de fH humano y fHbp (Schneider *et al.* ((2009) *Nature* 458:890-3)). La vista ampliada de la izquierda se centra en el resto de arginina de la posición 41, que muestra un enlace de H cargado con fH, que se predijo que se eliminaría al reemplazar la arginina por serina (recuadro inferior derecho). La figura se generó usando MacPyMol (www.pymol.org). El panel B muestra la secuencia de aminoácidos del factor humano H (fH), que también se conoce como n.º de acceso GenBank NP_000177 (P08603) y su ácido nucleico codificante como NM_000186.

Figura 10. Unión a fH (panel A) o anticuerpos monoclonales anti-fHbp JAR 4 (panel B) o JAR 5 (panel C) a mutantes R41S y R41A de fHbp ID 1, medida mediante ELISA. La unión a fH humano (panel A) y los anticuerpos monoclonales anti-fHbp (paneles B y C) se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 11. Unión de factor H humano (columna izquierda) o anticuerpo monoclonal JAR 4 anti-fHbp (columna derecha) a diferentes fHbp del grupo de variante 1 y sus correspondientes mutantes R41S. La unión se midió como se describe en el Ejemplo 2. Los paneles A y B muestran los resultados de unión para fHbp ID 4. Los paneles C y D muestran los resultados de unión para fHbp ID 9. Los paneles E y F muestran los resultados de unión para fHbp ID 74. "ID" se refiere al número de identificación de la variante de secuencia de aminoácidos de fHbp (ID), como se describe en el sitio Web de tipificación de secuencias de múltiples locus de *Neisseria* [http://pubmlst\(dot\)org/neisseria/fHbp/](http://pubmlst(dot)org/neisseria/fHbp/).

Figura 12. Unión a fH humano y anticuerpos monoclonales anti-fHbp de control a fHbp y mutantes R41S correspondientes de las fHbp del grupo de variante 2. Los paneles A y B muestran la unión del factor H humano a fHbp de tipo silvestre (WT) ID 19 y mutante R41S de fHbp ID 19. Los paneles C y D muestran la unión del factor H humano a fHbp WT ID 22 y al mutante R41S de fHbp ID 22. Los paneles E y F muestran la unión del factor H humano a fHbp WT ID 77 y al mutante R41S de fHbp ID 77. Los anticuerpos monoclonales de control fueron JAR 4 (Paneles B y D) o JAR 11 (Panel F).

Figura 13. Efecto del anticuerpo anti-fHbp sérico generado en ratones transgénicos para fH humano sobre la unión a fH a fHbp. La unión a fH a fHbp se midió mediante ELISA en diluciones 1:100 de sueros antes de la inmunización (panel A, preinmunes) y después de la inmunización (panel B, postinmunes) de ratones transgénicos individuales inmunizados con vacunas de fHbp de tipo silvestre ID 1 o fHbp ID 1 mutante R41S. Para los grupos de control de aluminio, los cuadrados sin rellenar representan datos de combinaciones de suero de ratones transgénicos cuyos sueros contienen fH humano y los triángulos rellenos representan datos de sueros de ratones de tipo silvestre cuyos sueros no contienen fH humano. Los valores de DO representan la cantidad de fH humano unido detectada con IgG anti-fH humano de oveja y anti-oveja de burro conjugada a fosfatasa alcalina. Panel C, títulos de IgG anti-fHbp en sueros tras la inmunización que muestran respuestas de anticuerpos similares a ambas vacunas. Panel D, inhibición de la unión a fH humano a fHbp en presencia de fH humano añadido. Panel E, relación del porcentaje de inhibición de la unión a fH y títulos de SBA de ratones transgénicos para fH humano inmunizados con vacunas de fHbp.

Figura 14. La unión a fH con un mutante K241E de fHbp ID 1 y su unión a anticuerpo monoclonal JAR 5 se muestran en los paneles A y B, respectivamente. La unión a fH con un mutante E241K de fHbp ID 15 y su unión a anticuerpo monoclonal JAR 5 se muestran en los paneles C y D, respectivamente. Se midió la unión a fH o anticuerpo monoclonal anti-fHbp a fHbp como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 15. Unión a fH o anticuerpos monoclonales anti-fHbp a H119A y mutantes únicos R130A de fHbp ID 1, medida por ELISA. La unión a fH humano (panel A) y anticuerpos monoclonales anti-fHbp JAR 5 (panel B) o JAR 4 (panel C), se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 16. Representación esquemática de los seis grupos modulares de fHbp más comunes, designados de I a VI. Cada uno de los segmentos variables se deriva de uno o dos linajes genéticos, designados α (mostrado en

gris) o β (blanco). Los linajes α y β también se pueden designar linajes 1 y 2, respectivamente, de acuerdo con la nomenclatura adoptada por el sitio Web pubmlst.org/neisseria/fHbp/. El segmento V_A comenzó en el resto de aminoácido 8 y se extendió hasta la posición 73, mientras que el segmento V_B comenzó en la posición 79 y se extendió hasta la posición 93 (numeración del resto de aminoácido basada en la secuencia de fHbp ID 1). El segmento V_C comenzó en el resto de aminoácido 98 y se extendió hasta la posición 159, mientras que el segmento V_D comenzó en la posición 161 y se extendió hasta la posición 180. El segmento V_E comenzó en el resto de aminoácido 186 y se extendió hasta la posición 253. De las 70 variantes de secuencia de aminoácidos de fHbp analizadas, 33 contenían solo segmentos de tipo α , y 7 contenían solo segmentos de tipo β , que se designaron grupos modulares I y II, respectivamente. Las 30 variantes de fHbp restantes eran quimeras naturales con diferentes combinaciones de segmentos α y β , y podrían asignarse a uno de cuatro grupos modulares (III-VI). Se muestra la relación entre el grupo modular y la designación del grupo de variantes de Massignani, y el número de secuencias únicas observadas dentro de cada grupo modular de fHbp. La arquitectura modular de la quimera I de fHbp diseñada (no natural) se muestra como el último esquema modular en la Figura 16. Para una proteína quimérica diseñada a partir de fHbp ID 1 e ID 77 "quimera I" (Beernink *et al.* (2008) *Infect. Immun.* 76:2568-2575), cuatro restos de aminoácido, GEHT (SEQ ID NO:27) de la posición 136 a 139 representa el punto de unión en el segmento V_C (véase la Figura 19). ID se refiere al número de identificación del péptido de la secuencia de fHbp como se describe en el sitio Web público, <http://pubmlst.org/neisseria/fHbp/>.

Figura 17. Unión a fH con el mutante recombinante de fHbp S41P (mutante de fHbp ID 15). La unión a fH con un mutante S41P de fHbp ID 15 se muestra en el Panel A. La unión del mutante S41P de fHbp ID15 a anticuerpo monoclonal JAR 5 y a anticuerpo monoclonal JAR31 se muestra en los paneles B y C, respectivamente. "Pep28" es fHbp ID 28; "Pép 1" es fHbp ID 1; "Pép 15 WT" es fHbp ID 15; y "Pép 15 S41P" es el mutante S41P de fHbp ID 15.

Figura 18. Unión a fH humano al mutante R41S de la quimera I de fHbp (Beernink *et al.* (2008) *Infect. Immun.* 76:2568-2575) (panel A) y la correspondiente unión de JAR 5 (panel B).

Figura 19. Panel A, Alineación de secuencias de fHbp de variantes naturales y una quimera artificial (quimera I, Beernink *et al.* (2008) *Infect. Immun.* 76:2568-2575). fHbp ID 1 está en el grupo modular I (los cinco segmentos variables, A-E, se derivan de linajes α según lo definido por Beernink y Granoff (2009) *Microbiology* 155:2873-83). fHbp ID 28 está en el grupo modular II (los cinco segmentos se derivan de linajes β). fHbp ID 15 es una quimera natural (grupo modular IV con un segmento β A y segmentos α B, C, D y E). El segmento A de tipo β (V_A , restos 8-73) de fHbp ID 28 se muestra para la comparación con el correspondiente segmento A (V_A) de fHbp ID 15, que también tiene un segmento A de tipo β ($V_A\beta$). Los restos modificados en fHbp mutante doble E218A/E239A se muestran en rectángulos. Panel B, alineación del segmento A (restos de aminoácidos 8 a 73) de fHbp ID 1 y fHbp ID 77. Panel C, alineación del segmento C (restos de aminoácidos 98-159) de fHbp ID 1 y fHbp ID 77. El punto de unión está en el resto 136. La fHbp quimérica incluye las secuencias de aminoácidos desde ID1 hasta el resto G136, y la secuencia de fHbp ID 77 desde el resto 136 hasta el extremo C. Panel D, alineación que muestra polimorfismos naturales en la posición de aminoácido 41 (número según el de fHbp ID 1); algunas variantes tienen arginina (R41, ID1, 19, 4, 9 y 74) mientras que otras variantes tienen serina (S41, ID55, 15) o prolina (P41, ID28). ID se refiere a ID de secuencia de fHbp; MG se refiere al grupo modular de fHbp; y VG se refiere al grupo de variante. Panel E, alineación de fHbp ID 1, fHbp ID 77 y quimera I. Los restos sombreados en fHbp ID 77 resaltan los restos del segmento V_C que son diferentes de las posiciones correspondientes en la quimera I. Los restos en negrita y sombreados corresponden a K113, K119 y D121, en orden del extremo N al extremo C.

Figura 20. Unión a fH o un anticuerpo monoclonal anti-fHbp a los mutantes sencillos K113A, K119A y D121A de fHbp ID 77, medida mediante ELISA. La unión a fH humano (panel A) y el anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR 31 (panel B) se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 21. Unión a fH o un anticuerpo monoclonal anti-fHbp a los mutantes dobles R41S/K113A, R41S/K119A y R41S/D121A de fHbp ID 77, medida mediante ELISA. La unión a fH humano (panel A) y el anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR 31 (panel B) se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 22. Unión a fH o un anticuerpo monoclonal anti-fHbp al mutante doble K113A/D121A y al mutante triple R41S/K113A/D121A de fHbp ID 77, medida mediante ELISA. La unión a fH humano (panel A) y el anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR 4 (panel B) y el anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR 31 (panel C) se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 23. La unión a fH a mutantes de fHbp ID 22, medida por ELISA. Unión a fH humano a D211A, R80A, o fHbp de tipo silvestre (panel A) a E218A, E248A, o fHbp de tipo silvestre (panel B) y a R41S, Q38A, Q126A, o fHbp de tipo silvestre (panel C) se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 24. Unión de anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR31 a mutantes de fHbp ID 22, medida mediante ELISA. La unión de los mutantes R80A y D211A (panel A) y la unión de los mutantes E218A y E248A (panel B) a JAR31 se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 25. Unión de anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR4 a mutantes de fHbp ID 22, medida mediante ELISA. La unión de los mutantes R80A y D211A (panel A) y la unión de los mutantes E218A y E248A (panel B) a JAR 4 se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 26. Unión de anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR35 a mutantes de fHbp ID 22, medida mediante ELISA. La unión de los mutantes R80A y D211A (panel A) y la unión de los mutantes E218A y E248A (panel B) a JAR35 se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 27. Unión a fH o anticuerpos monoclonales anti-fHbp a un mutante doble T221A/H223A o un mutante G236I de fHbp ID 22 medida mediante ELISA. La unión a fH humano (panel A) y los anticuerpos monoclonales

anti-fHbp JAR 31 (panel B), JAR 35 (panel C) o JAR 4 (panel D), se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 28. Unión a fH o anticuerpos monoclonales anti-fHbp a mutantes R41S, Q38A y A235G de fHbp ID 22 medida mediante ELISA. La unión a fH humano (panel A) y los anticuerpos monoclonales anti-fHbp JAR 31 (panel B) o JAR 35 (panel C) se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 29. Unión a fH o un anticuerpo monoclonal anti-fHbp a los mutantes Q126A, D201A y E202A de fHbp ID 22, medida mediante ELISA. La unión a fH humano (panel A) y el anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR 35 (panel B) se midió como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 30. Unión a mutantes de fHbp ID 28 (grupo de variante 3). Paneles A y C. Unión a fH a los mutantes K199A, E217A y E218A, medida por ELISA. Paneles B y D. Se muestra la unión de anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR 31 (panel B), y anticuerpo monoclonal anti-fHbp JAR 33 (panel D, fHbp de tipo silvestre ID 28 WT y E218A mutante solamente).

La Figura 31 representa los títulos bactericidas en suero de ratones BALB/c de tipo silvestre inmunizados con los mutantes indicados de la vacuna de fHbp ID1 y medidos contra la cepa H44/76 del grupo B (fHbp ID1).

La Figura 32 representa títulos bactericidas en suero de ratones inmunizados con los mutantes indicados de fHbp ID 22 medidos frente a la cepa del grupo W-135 Ghana 7/04 (fHbp ID 23). Panel superior, vacunas de mutantes con títulos que no fueron significativamente diferentes de la vacuna de fHbp ID 22 de tipo silvestre (WT) ($p > 0,10$). En el panel inferior, vacunas de mutantes que generaron títulos significativamente inferiores a los de la vacuna de control ID 22 WT ($p < 0,05$).

La Figura 33 representa los títulos bactericidas de ratones inmunizados con un mutante triple R41S/K113A/D121A de fHbp ID 77 medidos frente a la cepa del grupo W-135 Ghana 7/04 (fHbp ID 23).

Figura 34. Alineación de secuencias de aminoácidos de fHbp ID 1 (SEQ ID NO: 1), fHbp ID 22 (SEQ ID NO: 2), fHbp ID 77 (SEQ ID NO: 4), fHbp ID 28 (SEQ ID NO: 3) y quimera ID1/ID77 (SEQ ID NO: 8). ID 28 se muestra como una secuencia de referencia para el grupo de variante 3 de fHbp. Los restos predichos de la fase de contacto de unión del factor H con el enlace de hidrógeno o las interacciones iónicas (resaltadas en gris) de una estructura cristalina de fHbp ID1 en un complejo con un fragmento de fH, según lo descrito en Schneider *et al.* ((2009) *Nature* 458:890-3). GEHT (SEQ ID NO: 27) (en negrita) en la posición 136 a 139 representa el punto de unión entre ID 1 e ID 77 para la fHbp quimérica.

Figura 35. Alineación de secuencias de aminoácidos de fHbp ID 1 (SEQ ID NO:1), fHbp ID 22 (SEQ ID NO:2), fHbp ID 77 (SEQ ID NO:4), fHbp ID 28 (SEQ ID NO:3) y la quimera ID1/ID77 (SEQ ID NO:8). Los restos resaltados en gris indican restos mutados y resumidos en la Tabla 7.

La Figura 36 representa un modelo de fHbp en un complejo con un fragmento de fH. Se representan las posiciones de los restos de aminoácidos que se sabe que afectan a los epítomos de los anticuerpos monoclonales anti-fHbp JAR3 y JAR5 (G121 y K122) y el anticuerpo monoclonal 502 (R204).

Las Figuras 37A-D representan la unión de los anticuerpos monoclonales IgGa humanos específicos de fHbp quimérica de ratón de fHbp medida por ELISA (Panel A), resonancia de plasmón (Panel B) o bacterias vivas por citometría de flujo (Panel C, anticuerpo monoclonal solo y Panel D, anticuerpo monoclonal en presencia de un 20 % de suero humano empobrecido en IgG).

Las Figuras 38A-B representan la deposición de C4b dependiente de C1q a partir de la activación del complemento en bacterias del grupo B encapsuladas de la cepa H44/76 por anticuerpos monoclonales IgG1 humanos anti-fHbp quimérica de ratón JAR3, JAR5 y el anticuerpo monoclonal 502. Panel A, suero humano empobrecido en C1q como fuente del complemento; Panel B, suero empobrecido en C1q que se había repuesto con proteína C1q purificada antes de las reacciones. El panel C representa la actividad bactericida mediada por el complemento humano de los respectivos anticuerpos monoclonales medida frente a la cepa H44/76 del grupo B.

Las Figuras 39A-C representan la inhibición de la unión a fH por anticuerpos monoclonales anti-fHbp medida por ELISA con fHbp adherido a los pocillos de la placa de microtitulación (Panel A), y con bacterias vivas de la cepa H44/76 del grupo B medida por flujo citometría (paneles B y C).

Las Figuras 40A-C representan la unión a fH a mutantes de H44/76 del grupo B con inactivación genética de la expresión de fHbp, o tanto fHbp como NspA. Panel A, unión de un anticuerpo monoclonal anti-PorA de control; Paneles B y C, unión a fH en suero humano empobrecido en IgG.

Las Figuras 41A-E representan la actividad bactericida de anticuerpos monoclonales IgG humanos anti-fHbp quimérica de ratón medida frente a un mutante de H44/76 del grupo B con inactivación genética de NspA. Paneles A, B y C: anticuerpos monoclonales anti-fHbp JAR 3, JAR 5 y anticuerpo monoclonal 502, respectivamente; Paneles D y E: anticuerpos monoclonales anti-PorA de control y anticuerpos monoclonales anti-capsulares, respectivamente.

La Figura 42 representa la actividad bactericida frente a una cepa capsular del grupo A (Senegal 1/99) de un anticuerpo anti-NspA contra una fHbp desactivada de una cepa del grupo A (panel superior) o anticuerpo monoclonal anti-PorA de control P1.9 (panel inferior).

La Figura 43, Paneles A-C, representa respuestas de anticuerpos anti-fHbp en suero de ratones de tipo silvestre inmunizados con vacuna de fHbp recombinante o de vesículas de membrana externa nativas de mutantes de la cepa H44/76 del grupo B con sobreexpresión de fHbp o fHbp desactivada. Las respuestas de anticuerpos anti-fHbp a la vacunación medidas mediante ELISA (Panel A), o la capacidad de los anticuerpos anti-fHbp en suero para inhibir la unión a fH a fHbp (Paneles B y C, también mediante ELISA). Los ratones se inmunizaron con vacuna de fHbp recombinante ID1 (triángulos rellenos) o vacunas NOMV preparadas a partir de mutantes de la cepa H44/76 del grupo B con sobreexpresión de fHbp ID 1 (círculos sin rellenar) o fHbp desactivada (círculos rellenos).

La Figura 44 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de proteína A de superficie de *Neisseria* (NspA) (SEQ ID NO: 15).

Figura 45. Secuencias de aminoácidos de diversas proteínas de unión al factor H naturales (fHbp): fHbp ID 1, fHbp ID 15, fHbp ID 22, fHbp ID 28, fHbp ID 77 y quimera I (Beernink *et al.* (2008) *Infect. Immun.* 76:2568-2575).

Las secuencias de fHbp ID se muestran sin una secuencia líder. En la secuencia que se muestra para la quimera I, las letras en minúscula corresponden a la secuencia de aminoácidos que se deriva de fHbp ID 1, mientras que las letras en mayúscula corresponden al aminoácido que se deriva de ID 77.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que se incluye en la invención cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre el límite superior o inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido. La invención también engloba los límites superior e inferior de estos intervalos menores que pueden incluirse independientemente en los intervalos menores, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluya uno o ambos límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyan cualquiera de ambos de estos límites incluidos.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones que pertenecen a modificaciones de aminoácidos, incluyendo sustituciones de aminoácidos, con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia están específicamente englobadas por la presente invención, y se desvelan en el presente documento como si todas y cada una de las combinaciones se desvelaran individual y explícitamente, en la medida en que dichas combinaciones engloben polipéptidos que tengan características deseadas, por ejemplo, polipéptidos fHbp no naturales que tienen una menor afinidad por un fH humano que la de fHbp ID1. Además, todas las subcombinaciones de dichas modificaciones de aminoácidos (incluyendo las sustituciones de aminoácidos) enumeradas en las realizaciones que describen dichas modificaciones de aminoácidos también están específicamente englobadas por la presente invención y se desvelan en el presente documento como si todas y cada una de dichas subcombinaciones de dichas modificaciones de aminoácidos se desvelaran individual y explícitamente en el presente documento.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también se puede usar en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento desvelan y describen los métodos y/o materiales en relación con los que se citan las publicaciones.

Se ha de señalar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "una", y "el" y "ella" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así pues, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una pluralidad de dichos antígenos, y la referencia a "la proteína" incluye la referencia a una o más proteínas, etcétera.

Las publicaciones mencionadas en el presente documento se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento se ha de interpretar como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

Descripción detallada

Se proporcionan proteínas de unión al factor H que pueden generar anticuerpos que son bactericidas para al menos una cepa de *N. meningitidis*, y métodos de uso de dichas proteínas. La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden una fHbp no natural según lo definido en las reivindicaciones.

Definiciones

"Proteína de unión al factor H" (fHbp), que también se conoce en la literatura como GNA1870, GNA 1870, ORF2086, LP2086 (lipoproteína 2086) y "741" se refiere a una clase de polipéptidos de *N. meningitidis*. Se encuentra en la naturaleza como una lipoproteína de la superficie de cepas de la bacteria. *N. meningitidis*. Las fHbp se han subdividido en tres grupos de variantes de fHbp (denominadas variante 1 (v.1), variante 2 (v.2) y variante 3 (v.3) en algunos informes (Masignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-99), y la familia A y B en otros informes (véase, por ejemplo, Fletcher *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100)) basándose en la variabilidad y la reactividad inmunológica cruzada de las secuencias de aminoácidos (Masignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-99). A cada fHbp sola encontrada en *N. meningitidis* también se le asigna un ID de péptido fHbp de acuerdo con la página Web neisseria.org o pubmlst.org/neisseria/fHbp/. Debido a que la longitud de la proteína fHbp de variante 2 (v.2) (de la

cepa 8047, fHbp ID 77) y la fHBP de variante 3 (v.3) (de la cepa M1239, fHbp ID 28) difieren en -1 y +7 restos de aminoácidos, respectivamente, de la de MC58 (fHbp ID 1), la numeración usada para referirse a restos para las proteínas fHbp v.2 y v.3 difiere de la numeración basada en las secuencias de aminoácidos reales de estas proteínas. Así pues, por ejemplo, la referencia a un resto de leucina (L) en la posición 166 de la secuencia de fHBP v.2 o v.3 se refiere al resto de la posición 165 de la proteína v.2 y en la posición 173 en la proteína v.3.

El factor humano H ("fH humano"), como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la **Figura 9B** (SEQ ID NO: 9), y variantes alélicas humanas natural de la misma.

El término "heterólogo" o "quimérico" se refiere a dos componentes que están definidos por estructuras derivadas de diferentes fuentes o secuencias progenitoras. Por ejemplo, cuando se usa "heterólogo" en el contexto de un polipéptido quimérico, el polipéptido quimérico puede incluir secuencias de aminoácidos unidas operativamente que se pueden derivar de diferentes polipéptidos de diferentes grupos filogénicos (por ejemplo, un primer componente de una secuencia de aminoácidos progenitora α y un segundo componente de una secuencia de aminoácidos progenitora β). Un polipéptido quimérico que contiene dos o más segmentos definidos, cada uno de los cuales es de un progenitor diferente, puede ser natural o artificial (de origen no natural). Véase Beernink P. T., Granoff D. M. (2009) *Microbiology* 155:2873-83 para más detalles sobre quimeras naturales. Las quimeras no naturales se refieren a "quimeras artificiales", y engloban fHbp con componentes heterólogos que no se encuentran en la naturaleza.

Un polipéptido "heterólogo" o "quimérico" también puede contener dos o más componentes diferentes, cada uno derivado de una fHbp diferente (por ejemplo, la variante 1, 2 o 3). El componente puede estar unido operativamente en cualquier posición a lo largo del polipéptido fHbp.

"Heterólogo" en el contexto de un polinucleótido que codifica cualquier polipéptido quimérico descrito anteriormente puede incluir la secuencia de ácido nucleico unida operativamente que puede derivarse de diferentes genes (por ejemplo, un primer componente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido fHBP v.1 y un segundo componente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido fHBP v.2) o diferentes secuencias de aminoácidos progenitoras (α o β).

Otros ejemplos de ácidos nucleicos "heterólogos" incluyen construcciones de expresión en las que un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante está unido operativamente a un elemento regulador (por ejemplo, un promotor) que es de un origen genético diferente del de la secuencia codificante (por ejemplo, proporcionar la expresión en una célula hospedadora de interés, que puede ser de diferente origen genético en relación con el promotor, la secuencia codificante o ambos). Por ejemplo, se dice que un promotor T7 unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido fHbp o dominio del mismo es un ácido nucleico heterólogo.

"Heterólogo" en el contexto de las células recombinantes puede referirse a la presencia de un ácido nucleico (o producto génico, tal como un polipéptido) que es de un origen genético diferente al de la célula hospedadora en la que está presente. Por ejemplo, un aminoácido o una secuencia de ácido nucleico de *Neisseria* de una cepa es heterólogo a un hospedador de *Neisseria* de otra cepa.

Derivada de", en el contexto de una secuencia de aminoácidos o secuencia de polinucleótido (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos "derivada de" fHbp ID 1) pretende indicar que el polipéptido o el ácido nucleico tiene una secuencia que se basa en la de un polipéptido o ácido nucleico de referencia (por ejemplo, una proteína fHBP natural o ácido nucleico codificante), y no pretende limitarse a la fuente ni al método en el que se crea la proteína o el ácido nucleico. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos de referencia y polinucleótidos de referencia a partir de los que se puede derivar una secuencia de aminoácidos o una secuencia de polinucleótidos incluyen una fHbp natural, fHbp ID1 y una fHbp no natural. "Derivada de" en el contexto de las cepas bacterianas pretende indicar que una cepa se obtuvo a través del paso *in vivo*, o en cultivo *in vitro*, de una cepa parental y/o es una célula recombinante obtenida mediante la modificación de una cepa parental.

"Sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido con otro que comparte las propiedades químicas y físicas de la cadena lateral de aminoácidos (por ejemplo, carga, tamaño, hidrofobicidad/hidrofiliadad). Las "sustituciones conservativas" pretenden incluir la sustitución dentro de los siguientes grupos de restos de aminoácidos: Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Se puede obtener orientación para dichas sustituciones de las alineaciones de secuencias de aminoácidos de polipéptidos que presentan el epítipo de interés.

La expresión "inmunidad protectora" significa que un programa de vacunación o inmunización que se administra a un mamífero induce una respuesta inmune que previene, retrasa el desarrollo de o reduce la gravedad de una enfermedad que está causada por *Neisseria meningitidis*, o disminuye o elimina por completo los síntomas de la enfermedad. La inmunidad protectora puede estar acompañada por la producción de anticuerpos bactericidas. Cabe señalar que la producción de anticuerpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* se acepta en el campo como predictiva de un efecto protector de la vacuna en seres humanos (Goldschneider *et al.* (1969) *J. Exp. Med.* 129:1307; Borrow *et al.* (2001) *Infect Immun.* 69:1568).

La expresión "una enfermedad causada por una cepa de *Neisseria meningitidis*" engloba cualquier síntoma clínico o combinación de síntomas clínicos que están presentes en una infección en un ser humano con *Neisseria meningitidis*. Estos síntomas incluyen, pero sin limitación: la colonización del tracto respiratorio superior (por ejemplo, la mucosa de la nasofaringe y las amígdalas) por una cepa patógena de *Neisseria meningitidis*, la penetración de las bacterias en la mucosa y en el lecho vascular submucoso, septicemia, choque séptico, inflamación, lesiones cutáneas hemorrágicas, activación de la fibrinólisis y de la coagulación sanguínea, disfunción de órganos tales como riñón, pulmón e insuficiencia cardíaca, hemorragia suprarrenal e infarto muscular, filtración capilar, edema, isquemia periférica en extremidades, síndrome de distrés respiratorio, pericarditis y meningitis.

La expresión "se une específicamente a un anticuerpo" o "específicamente inmunorreactivo con", en el contexto de un antígeno (por ejemplo, un antígeno polipeptídico), se refiere a una reacción de unión que se basa en y/o demuestra la presencia del antígeno en una muestra que también puede incluir una población heterogénea de otras moléculas. Por lo tanto, en las condiciones indicadas, el anticuerpo o los anticuerpos específico/s se une/n a uno o más antígenos en particular de una muestra y no se une/n, en una cantidad significativa, a otras moléculas presentes en la muestra. La expresión "se une específicamente a un anticuerpo" o "específicamente inmunorreactivo con", en el contexto de un epítipo de un antígeno (por ejemplo, un epítipo de un polipéptido) se refiere a una reacción de unión que se basa en y/o demuestra la presencia del epítipo de un antígeno (por ejemplo, un polipéptido) que también puede incluir una población heterogénea de otros epítopos, así como una población heterogénea de antígenos. Por lo tanto, en las condiciones indicadas, el anticuerpo o los anticuerpos específico/s se une/n a un determinado epítipo de un antígeno y no se unen en una cantidad significativa a otros epítopos presentes en el antígeno y/o en la muestra.

La expresión "en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmune" significa que hay una diferencia detectable entre un indicador de respuesta inmune medido antes y después de la administración de un determinado preparado de antígeno. Los indicadores de respuesta inmune incluyen, pero sin limitación: el título o la especificidad de los anticuerpos, detectados mediante un ensayo, tal como el inmunoensayo ligado a una enzima (ELISA), un ensayo bactericida, citometría de flujo, inmunoprecipitación, inmunodifusión de Ouchter-Lowny; ensayos de detección de la unión, por ejemplo, de manchas, de transferencia Western o de matrices de antígenos; ensayos de citotoxicidad, etc.

Un "antígeno de superficie" es un antígeno que está presente en una estructura de la superficie de *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, la membrana externa, cápsula, pili, etc.).

"Aislado" se refiere a una entidad de interés que se encuentra en un ambiente diferente de aquel en el que el compuesto se puede encontrar de manera natural. "Aislado" pretende incluir los compuestos que están en las muestras que están esencialmente enriquecidas en el compuesto de interés y/o en las que el compuesto de interés está parcial o esencialmente purificado.

"Enriquecido/a" significa que una muestra se ha manipulado de manera no natural (por ejemplo, por un experimentador o un clínico) de modo que un compuesto de interés está presente a una concentración superior (por ejemplo, al menos tres veces superior, al menos 4 veces superior, al menos 8 veces superior, al menos 64 veces superior o superior) a la concentración del compuesto en la muestra de partida, tal como una muestra biológica (por ejemplo, una muestra en la que el compuesto se produce de forma natural o en la que está presente después de la administración), o en la que se creó el compuesto (por ejemplo, como en un polipéptido bacteriano, anticuerpo, polipéptido y similares).

La "desactivación" en el contexto de un gen diana se refiere a una modificación de la secuencia del gen que da lugar a una disminución de la función del gen diana, por ejemplo, de manera que la expresión del gen diana sea indetectable o insignificante, y/o el producto génico no sea funcional o significativamente funcional. Por ejemplo, una "desactivación" de un gen implicado en la síntesis de LPS indica que la función del gen se ha reducido sustancialmente de modo que la expresión del gen no es detectable o solo está presente a niveles insignificantes y/o una actividad biológica del producto génico (por ejemplo, una actividad enzimática) se reduce significativamente con respecto a cómo era antes de la modificación o no es detectable. Las "desactivaciones" engloban desactivaciones condicionales, en las que se puede producir la modificación del gen diana, por ejemplo, tras la exposición a un conjunto predefinido de condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolaridad, exposición a la sustancia que potencia la alteración del gen diana, y similares). Una "activación" de un gen diana se refiere a una modificación genética de un gen que da lugar a un aumento de una función proporcionada por el gen diana.

POLIPÉPTIDOS fHbp CON PROPIEDADES DE UNIÓN A fH MODIFICADAS

Antes de describir fHBP adicionales contempladas por la presente divulgación, es útil describir algunas fHBP natural. Las únicas fHbp naturales que se encuentran en *N. meningitidis* reciben cada una un ID de péptido fHbp de acuerdo con los sitios Web neisseria.org y pubmlst.org/neisseria/fHbp. Esta convención de denominación de las fHbp se adoptará a lo largo de la presente divulgación.

Por comodidad y con el fin de aclarar, se selecciona la secuencia de aminoácidos nativa de fHbp ID 1 (fHbp v.1 de la cepa MC58 de *N. meningitidis*) como una secuencia de referencia para todas las secuencias de aminoácidos de fHBP naturales y no naturales que engloban fHbp quiméricas y variantes de fHbp descritas en el presente documento. La secuencia de aminoácidos de fHbp ID 1 se muestra en la **Figura 45** y se presenta a continuación:

fHbp ID1

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLA
 QGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALT
 AFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGG
 KLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGS
 YSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 1).

Al hacer referencia a una posición de resto de aminoácido en una fHbp, el número de posición usado en el presente documento corresponde al número de resto de aminoácido de fHbp ID1. Véase la Figura 19 para una alineación de varias fHbp y los restos de aminoácidos de cada fHbp correspondientes a los de fHbp ID1. Como se ve en la Figura 19 y SEQ ID NO: 1, la posición número 1 se refiere al primer resto de aminoácido mostrado en fHbp ID 1, que es una cisteína. La fHbp a la que se hace referencia en el presente documento a veces puede contener una secuencia líder adicional en el extremo N-terminal. Por ejemplo, fHbp ID 1 puede tener una secuencia líder de MNRTAFCCLSLTALILTA (SEQ ID NO: 16) en el extremo N-terminal. Sin embargo, la posición de aminoácido número 1 de cualquier fHbp todavía se define en el presente documento como la posición que corresponde a la cisteína en la posición de aminoácido 1 mostrada anteriormente para fHbp ID 1 en una alineación, aminoácido que es el primer resto después de la secuencia líder, si está presente. Véase la Figura 19 para más detalles.

La presente divulgación proporciona fHbp, composiciones que las comprenden y métodos de uso de fHbp y composiciones. Una fHbp objeto tiene una afinidad menor por el fH humano que una fHbp de referencia correspondiente (por ejemplo, una fHbp que se produce de manera natural u otra fHbp de referencia). Debido a que una fHbp de alta afinidad tiene una alta probabilidad de formar complejos con fH, el fH unido puede enmascarar uno o más epítomos en la fHbp del sistema inmune del hospedador. Por consiguiente, fHbp que forma un complejo y/o que está unida con fH puede no ser un inmunógeno tan eficaz como una fHbp que no forme un complejo de este tipo. Por el contrario, las fHbp que tienen una afinidad relativamente baja por fH, cuando se administran como un inmunógeno (por ejemplo, en una composición de vacuna), pueden presentar epítomos hacia el sistema inmune de un hospedador inmunizado que una fHbp que tiene alta afinidad por fH no lo hace, como tales, los epítomos pueden ser enmascarados por el fH unido. Las fHbp objeto tienen una baja afinidad hacia el fH humano y son útiles para generar anticuerpos bactericidas y/o proporcionar inmunidad protectora contra *N. meningitidis*. Una fHbp objeto es una fHbp no natural. Una fHbp no natural no se encuentra en la naturaleza y es creada por un ser humano y/o modificada intencionalmente por un ser humano. Una fHbp objeto no natural se puede crear a través de síntesis química o métodos recombinantes.

Como se usa en el presente documento, "baja afinidad", "afinidad inferior" o "aglutinante bajo de fH" se refiere a las fHbp que tienen una afinidad de unión hacia un fH humano que es tan baja como o inferior a la de fHbp ID1. Por consiguiente, las fHbp objeto pueden englobar fHbp ID 14 y fHbp 15, ya que fHbp ID 14 y fHbp ID 15 tienen una afinidad menor hacia el fH humano con respecto a fHbp ID 1.

La afinidad de unión de las fHbp de baja afinidad y el fH humano puede ser no superior al aproximadamente 100 %, no superior al aproximadamente 95 %, no superior al aproximadamente 90 %, no superior al aproximadamente 85 %, superior al aproximadamente 80 %, no superior al aproximadamente 75 %, no superior al aproximadamente 70 %, no superior al aproximadamente 65 %, no superior al aproximadamente 60 %, no superior al aproximadamente 50 %, no superior al aproximadamente 45 % o inferior a la afinidad de fHbp de alta afinidad (por ejemplo, fHbp ID 1) y fH humano. Por ejemplo, una fHbp objeto puede tener una afinidad hacia fH humano que se inferior al aproximadamente 50 % de la afinidad de fHbp ID 1 hacia el fH humano.

En algunas realizaciones, la afinidad de unión de una fHbp objeto no natural hacia el fH humano es del 85 % de la o inferior a la afinidad de unión de una fHbp de tipo silvestre hacia el fH humano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la afinidad de unión de una fHbp objeto no natural hacia el fH humano es del aproximadamente 85 % al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 % al aproximadamente 65 %, del aproximadamente 65 % al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 % al aproximadamente 45 %, del aproximadamente 45 % al aproximadamente 35 %, del aproximadamente 35 % al aproximadamente 25 %, del aproximadamente 25 % al aproximadamente 15 %, del aproximadamente 15 % al aproximadamente 10 %, del aproximadamente 10 % al aproximadamente 5 %, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 2 %, del aproximadamente 2 % al aproximadamente 1 % o del aproximadamente 1 % al aproximadamente 0,1 %, o inferior al 0,1 %, de la afinidad de

unión de una fHbp de tipo silvestre hacia el fH humano. Como ejemplo, en algunas realizaciones, la afinidad de unión de una fHbp objeto no natural hacia el fH humano es del aproximadamente 85 % al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 % al aproximadamente 65 %, del aproximadamente 65 % al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 % al aproximadamente 45 %, del aproximadamente 45 % al aproximadamente 35 %, del aproximadamente 35 % al aproximadamente 25 %, del aproximadamente 25 % al aproximadamente 15 %, del aproximadamente 15 % al aproximadamente 10 %, del aproximadamente 10 % al aproximadamente 5 %, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 2 %, del aproximadamente 2 % al aproximadamente 1 % o del aproximadamente 1 % al aproximadamente 0,1 %, o inferior al 0,1 %, de la afinidad de unión a fHbp ID 1 hacia el fH humano.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la afinidad de unión de un mutante objeto de fHbp ID1 (por ejemplo, un mutante R41S, R41A, R130A, H119A, E218A o E239A de fHbp ID1) hacia el fH humano es del aproximadamente 85 % al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 % al aproximadamente 65 %, del aproximadamente 65 % al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 % al aproximadamente 45 %, del aproximadamente 45 % al aproximadamente 35 %, del aproximadamente 35 % al aproximadamente 25 %, del aproximadamente 25 % al aproximadamente 15 %, del aproximadamente 15 % al aproximadamente 10 %, del aproximadamente 10 % al aproximadamente 5 %, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 2 %, del aproximadamente 2 % al aproximadamente 1 % o del aproximadamente 1 % al aproximadamente 0,1 %, o inferior al 0,1 %, de la afinidad de unión a fHbp ID1 hacia el fH humano.

Como otro ejemplo, en algunas realizaciones, la afinidad de unión de un mutante objeto de fHbp ID 4, ID 9 o ID 74 (por ejemplo, un mutante R41S de fHbp ID4, ID9 o ID74) hacia el fH humano es del aproximadamente 85 % al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 % al aproximadamente 65 %, del aproximadamente 65 % al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 % al aproximadamente 45 %, del aproximadamente 45 % al aproximadamente 35 %, del aproximadamente 35 % al aproximadamente 25 %, del aproximadamente 25 % al aproximadamente 15 %, del aproximadamente 15 % al aproximadamente 10 %, del aproximadamente 10 % al aproximadamente 5 %, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 2 %, del aproximadamente 2 % al aproximadamente 1 % o del aproximadamente 1 % al aproximadamente 0,1 %, o inferior al 0,1 %, de la afinidad de unión a fHbp ID4, ID9 o ID74 hacia el fH humano, o de la afinidad de unión a fHbp ID1 hacia el fH humano.

Como otro ejemplo, en algunas realizaciones, la afinidad de unión de un mutante objeto de fHbp ID 22 (por ejemplo, un mutante R80A, D211A, E218A, E248A, G236I o T221A/H223A de fHbp ID22) hacia el fH humano es del aproximadamente 85 % al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 % al aproximadamente 65 %, del aproximadamente 65 % al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 % al aproximadamente 45 %, del aproximadamente 45 % al aproximadamente 35 %, del aproximadamente 35 % al aproximadamente 25 %, del aproximadamente 25 % al aproximadamente 15 %, del aproximadamente 15 % al aproximadamente 10 %, del aproximadamente 10 % al aproximadamente 5 %, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 2 %, del aproximadamente 2 % al aproximadamente 1 % o del aproximadamente 1 % al aproximadamente 0,1 %, o inferior al 0,1 %, de la afinidad de unión a fHbp ID 22 hacia el fH humano, o de la afinidad de unión a fHbp ID 1 hacia el fH humano.

Como otro ejemplo, en algunas realizaciones, la afinidad de unión de un mutante objeto de fHbp ID 77 (por ejemplo, un mutante R41S/K113A, R41S/K119A, R41S/D121A o R41S/K113A/D121A de fHbp ID 77) hacia el fH humano es del aproximadamente 85 % al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 % al aproximadamente 65 %, del aproximadamente 65 % al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 % al aproximadamente 45 %, del aproximadamente 45 % al aproximadamente 35 %, del aproximadamente 35 % al aproximadamente 25 %, del aproximadamente 25 % al aproximadamente 15 %, del aproximadamente 15 % al aproximadamente 10 %, del aproximadamente 10 % al aproximadamente 5 %, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 2 %, del aproximadamente 2 % al aproximadamente 1 % o del aproximadamente 1 % al aproximadamente 0,1 %, o inferior al 0,1 %, de la afinidad de unión a fHbp ID 77 hacia el fH humano, o de la afinidad de unión a fHbp ID 1 hacia el fH humano.

Como otro ejemplo, en algunas realizaciones, la afinidad de unión de un mutante objeto de fHbp ID 28 (por ejemplo, un mutante E218A o fHbp ID 28; un mutante K199A de fHbp ID 28) hacia el fH humano es del aproximadamente 85 % al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 % al aproximadamente 65 %, del aproximadamente 65 % al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 % al aproximadamente 45 %, del aproximadamente 45 % al aproximadamente 35 %, del aproximadamente 35 % al aproximadamente 25 %, del aproximadamente 25 % al aproximadamente 15 %, del aproximadamente 15 % al aproximadamente 10 %, del aproximadamente 10 % al aproximadamente 5 %, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 2 %, del aproximadamente 2 % al aproximadamente 1 % o del aproximadamente 1 % al aproximadamente 0,1 %, o inferior al 0,1 %, de la afinidad de unión a fHbp ID 28 hacia el fH humano, o de la afinidad de unión a fHbp ID 1 hacia el fH humano.

La afinidad de unión se puede describir en términos de la constante de disociación (K_D). Las fHbp de baja afinidad y el fH humano pueden tener una constante de disociación (K_D ; M) que sea al menos superior al aproximadamente 80 %, al menos superior al aproximadamente 100 %, al menos superior al aproximadamente 120 %, al menos superior al aproximadamente 140 %, al menos superior al aproximadamente 160 %, al menos superior al

aproximadamente 200 % o superior a la K_D de las fHbp de alta afinidad (por ejemplo, fHbp ID 1) y el fH humano. La K_D de una fHbp de baja afinidad también se puede describir como aproximadamente x2 (2 veces), aproximadamente x3, aproximadamente x5, aproximadamente x10, aproximadamente x15, aproximadamente x20, hasta aproximadamente 50 o más veces la K_D de fHbp ID1. Por ejemplo, una fHbp objeto y el fH humano pueden tener una K_D que sea 110 % de o aproximadamente x15 la de fHbp ID 1 y el fH humano.

Como se usa en el presente documento, "afinidad inferior hacia el fH humano que una fHbp correspondiente" se usa para describir las fHbp que tienen una afinidad de unión inferior a una fHbp de referencia correspondiente.

En muchos casos, la fHbp correspondiente (la "fHbp de referencia") usada para comparar las afinidades de unión de las fHbp objeto es fHbp ID 1. Otra fHbp correspondiente que puede ser representativa como referencia incluye la variante 2 de fHbp (por ejemplo, fHbp ID 22 o 77), la variante 3 (por ejemplo, fHbp ID 28) (Massignani *et al.*, (2003) *J Exp Med* 197:789-99 y Pajon R. *et al.*, (2010) *Vaccine* 28:2122-9), otras fHbp de variante 1 (por ejemplo, fHbp ID 4, 9 o 94), una fHbp quimérica natural o una fHbp quimérica artificial.

Las secuencias de aminoácidos de algunos ejemplos de fHbp natural y una quimérica artificial se proporcionan a continuación y se muestran en la Figura 45.

FHbp ID 22

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAECT
YGNGLSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKI
NNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFT
KKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGD
RAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 2)

FHbp ID 28

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTSLAQQG
AEKTFKAGDKDNLNTGKLKNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAV
VALQIEKINNPKTDLSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNG
RLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:3)

FHbp ID 77

CSSGGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAECT
YGNGLSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKI
NNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDF
AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFG
DRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:4)

FHbp ID 15

CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTL
TSLAQAERTFKAGDKDNLNTGKLKNDKISRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ
SHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFA
GSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSLY
NQAEGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 5)

FHbp ID 6

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLA
 QGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVNGQLITLESGEFQVYKQSHSALT
 ALQTEQVQDSEHSRKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGD SATYRGTAFGSDDAG
 GKLYTIDFAAKQGYGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKG
 SYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTANGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO:6)

5 FHbp ID 14

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLA
 QGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALT
 ALQTEQE QDPEHSGKMVAKR RFKIGDIAGEHTSFDKLPKDV MATYRGTAFGSDDAG
 GKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKG
 SYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO:7)

Quimera I

10 cssggggvaadigagladaltapldhdkglqsltdqsvrkneklklaa qgaektygngdslntgklkndkvsrfd firqiev d g q l i t l e s g e f q v y k q s h s a l t a f q t
 eqiqdsehsgkmvakrqfrigidiaGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAA
 ELKADEKSHAVILGDT RYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO:8) (Beernink *et*
 15 *al.* (2008) *Infec. Immun.* 76:2568-2575). Como se indica en la Figura 45, las letras en minúscula corresponden a la
 secuencia de aminoácidos que se deriva de fHbp ID 1, mientras que las letras en mayúscula corresponden al
 aminoácido que se deriva de fHbp ID 77. La posición correspondiente a R41 de fHbp ID 1 es la minúscula en negrita
 "r".

20 La fHbp correspondiente puede ser una fHbp natural y/o no natural (por ejemplo, quimérica artificial) a partir de la
 que se deriva la fHbp objeto. Las quiméricas natural abarcan fHbp que tienen segmentos variables derivados de
 diferentes progenitores (α o β). Debido a los segmentos variables, la arquitectura molecular ha demostrado ser
 modular y las variantes de fHbp pueden subclasificarse en grupos modulares de acuerdo con diferentes
 combinaciones de cinco segmentos variables, cada uno derivado de uno de dos linajes genéticos, designados tipos
 25 α o β (Pajon R. *et al.* (2010) *Vaccine* 28:2122-9; Beernink P. T., Granoff D. M. (2009) *Microbiology* 155:2873-8). Seis
 grupos modulares, designados de I a VI representan > 95 % de todas las variantes de fHbp conocidas (Pajon R *et al.*
 (2010) *Vaccine* 28:2122-9). Véase la Figura 16 para consultar las arquitecturas de grupo modulares de las fHbp
 naturales.

30 La fHbp correspondiente puede ser una fHbp que tenga una identidad de secuencia de aminoácidos alta como la
 fHbp objeto (por ejemplo, del al menos aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos
 aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 80 % o al menos
 aproximadamente el 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos) en un segmento (por ejemplo, segmento
 variable como se define en una arquitectura modular) o en la proteína madura completa.

35 Las fHbp correspondientes usadas como referencias para comparar las afinidades de unión de la fHbp objeto
 también pueden abarcar fHbp que tengan uno o más segmentos del mismo progenitor (α o β) en segmentos
 correspondientes de la fHbp objeto.

40 La fHbp objeto puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos aproximadamente 75 %, al
 menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos
 aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, de identidad de
 secuencia de aminoácidos con una fHbp de referencia; y que difiera de la secuencia de aminoácidos de la fHbp de
 referencia de 1 aminoácido (aa) a 10 aminoácidos, por ejemplo, difiere de la secuencia de aminoácidos de la fHbp
 de referencia en 1 aa, 2 aa, 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa o 10 aa. Por lo tanto, por ejemplo, una fHbp
 45 objeto puede tener, como máximo, una, como máximo dos, como máximo tres, como máximo cuatro, hasta como
 máximo 10 o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones, eliminaciones o inserciones) con respecto a una fHbp
 natural y/o no natural (por ejemplo, quimérica) a partir de la que se deriva la fHbp objeto. La una o más alteraciones
 de aminoácidos pueden disminuir la afinidad de la fHbp hacia el fH humano con respecto a una fHbp que no esté
 alterada. Como se ha indicado anteriormente, las fHbp de los que se deriva la fHbp objeto abarcan fHbp natural y
 50 fHbp de origen no natural. Las fHbp no naturales pueden abarcar quimeras artificiales, tales como las conocidas en

la técnica y descritas en la solicitud PCT número WO 2009/114485.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, una fHbp objeto comprende una sola sustitución de aminoácido con respecto a una fHbp de referencia (por ejemplo, cuando la fHbp de referencia es una fHbp natural (por ejemplo, fHbp ID1, o una quimérica artificial). En algunas realizaciones, una fHbp objeto comprende una sola sustitución de aminoácido (es decir, la sustitución de un solo aminoácido) con respecto a una fHbp natural (por ejemplo, fHbp ID 6, fHbp ID 14, fHbp ID 15, fHbp ID 22, fHbp ID 28, fHbp ID 77, u otra fHbp natural). Las secuencias de aminoácidos de fHbp ID 1, fHbp ID 15, fHbp ID 22, fHbp ID 28 y fHbp ID 77 se muestran en las Figuras 19 y 45; las secuencias de aminoácidos de fHbp ID 6 y fHbp ID 14 se proporcionan anteriormente. En algunas realizaciones, una fHbp objeto comprende una sola sustitución de aminoácido (es decir, la sustitución de un solo aminoácido) con respecto a fHbp ID1. En algunas realizaciones, una fHbp objeto comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a una fHbp de referencia. En algunas realizaciones, una fHbp objeto comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a fHbp ID1. En algunas realizaciones, una fHbp objeto comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a una fHbp natural (por ejemplo, fHbp ID 6, fHbp ID 14, fHbp ID 15, fHbp ID 28, como se muestra en la Figura 19, u otra fHbp natural). En algunas realizaciones, una fHbp objeto comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de una de fHbp ID 1, fHbp ID 15, fHbp ID 22, fHbp ID 28 y fHbp ID 77.

La posición del resto de aminoácido en la que se introduce una alteración puede determinarse comparando las secuencias de aminoácidos de los aglutinantes de fH bajos (por ejemplo, fHbp ID 14 y/o fHbp ID 15) con las fHbp de afinidad comparable hacia el fH humano como fHbp ID 1, por ejemplo. Las fHbp de una afinidad comparable hacia el fH humano como fHbp ID 1 o superior se denominan en el presente documento "aglutinantes de fH altos". Algunos ejemplos de aglutinantes de fH altos incluyen fHbp ID 1, fHbp ID 6 y fHbp ID 28. Los aglutinantes de fH bajos y los aglutinantes de fH altos que comparten uno o más segmentos progenitores se pueden comparar en una alineación de secuencias. Véase la Figura 19 como ejemplo de una alineación de secuencias para determinar las alteraciones de los aminoácidos que se pueden realizar en una fHbp natural con el fin de obtener la fHbp objeto.

Una variante de fHbp objeto puede derivarse de (por ejemplo, puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a) una fHbp variante 1, una variante 2 de fHbp o una fHbp variante 3. Una variante de fHbp objeto puede derivarse (por ejemplo, puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a) una fHbp de grupo modular I, una fHbp de grupo modular II, una fHbp de grupo modular III, una fHbp de grupo modular IV, una fHbp de grupo modular V, una fHbp de grupo modular VI, una fHbp de grupo modular VII, una fHbp de grupo modular VIII, una fHbp de grupo modular IX o una fHbp de grupo modular X.

Las sustituciones de aminoácidos en comparación con una fHbp de referencia que probablemente den como resultado una fHbp con afinidad reducida hacia el fH incluyen sustituciones de aminoácidos de los aminoácidos de fHbp que son restos de contacto para unirse a fH; sustituciones de aminoácidos de los aminoácidos de fHbp que están expuestos a la superficie; sustituciones de aminoácidos de aminoácidos de fHbp en la superficie de contacto entre los dominios amino-terminal y carboxilo-terminal; y sustituciones de aminoácidos de aminoácidos de fHbp que son próximos a un resto de unión a fH, donde un aminoácido que es "próximo a" un aminoácido de unión a fH es un aminoácido que tiene de uno a diez restos amino-terminales o carboxilo-terminales del aminoácido de unión a fH. En ciertas realizaciones, la sustitución de aminoácidos que da lugar a una baja afinidad por fH no es un resto de contacto de fH. Ciertos restos de contacto se muestran en negrita en la Figura 19.

Cuando una fHbp contiene una sustitución de aminoácido con respecto a una fHbp natural o con respecto a fHbp ID1, la sustitución de aminoácido puede ser conservativa con respecto a la sustitución de aminoácido. Por ejemplo, si R41 se modifica a S, realizando una sustitución R41S, y en particular, cuando la sustitución R41S da lugar a una afinidad reducida hacia fH humano, la presente divulgación contempla sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a S, de modo que también se contempla la sustitución de aminoácido R41T.

La presente descripción proporciona una fHbp no natural que tiene una sustitución de aminoácido en la posición 41 con respecto a fHbp ID1, donde la sustitución de aminoácido es de una estructura que interrumpe la interacción de fHbp con el factor H humano, pero hace que la fHbp mutante conserve inmunogenicidad. Los aminoácidos adecuados para la sustitución en la posición 41 con respecto a fHbp ID1 incluyen restos hidrófobos (por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro); restos polares pequeños (por ejemplo, Ser, Cys, Thr, Met, Asn, Gln); restos cargados pequeños (por ejemplo, Asp, Glu); y restos hidrófobos grandes (por ejemplo, Phe, Trp). Los ejemplos de sustituciones que se predice que no interrumpen significativamente la interacción de fHbp con el factor H humano, y por lo tanto, deben evitarse, incluyen: los restos cargados grandes (por ejemplo, Lys).

En algunas realizaciones, se excluyen específicamente las sustituciones de aminoácidos en uno o más de los siguientes restos: R41, Q38, Q87, Q113, K113, K119, D121, G121, Q126, Q128, R130, D201, E202, E218, A235, E239 y K241. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando una fHbp objeto comprende una sola sustitución de aminoácido con respecto a una fHbp de referencia (por ejemplo, cuando la fHbp de referencia es una fHbp natural o es fHbp ID1), la sustitución de un solo aminoácido puede estar en la posición E218 o E239.

Las alteraciones de aminoácidos encontradas en la fHbp objeto abarcan aquellas mostradas como restos sombreados y/o encuadrados en la Figura 19, y se enumeran a continuación. En un ejemplo de análisis de secuencias, el segmento A (V_A; restos 8-73) de fHbp ID 15 bajo aglutinante se compara con el V_A de la misma secuencia progenitora en un alto aglutinante de fH, fHbp ID28. Como tales, los segmentos de V_A tanto de fHbp ID 15 como fHbp ID 28 son idénticos en la secuencia de aminoácidos excepto en las posiciones de los restos 41 y 60. Como se ve en la Figura 19, fHbp 15 tiene S41 y R60 en V_A; fHbp ID 28 tiene P41 y K60. Basándose en este análisis, las posiciones de restos de aminoácidos correspondientes a 41 y 60 de fHbp ID 15 son posiciones candidatas en las que puede introducirse la alteración para obtenerse la fHbp objeto. En otras palabras, una fHbp de referencia que no tiene S ni R en las posiciones de restos correspondientes a 41 y 60 de fHbp ID 15, respectivamente, puede mutarse para tener S y/o R en las posiciones correspondientes a 41 y 60 de fHbp ID 15. La fHbp objeto que comprende una o más sustituciones de aminoácidos puede tener entonces una afinidad menor hacia el fH humano que sin las sustituciones (por ejemplo, S41P, S41A, R41P o R41A). Dichas fHbp están abarcadas por las fHbp objetos, y son útiles como inmunógeno para generar anticuerpos bactericidas en sujetos que los necesiten.

Las posiciones de restos candidatos adicionales en las que se puede introducir una alteración de aminoácido se tratan en los siguientes ejemplos. Por ejemplo, una fHbp de la presente divulgación puede tener una sustitución de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a uno o más restos de aminoácido seleccionados de 41, 60, 114, 113, 117, 119, 121, 128, 130, 147, 148, 149, 178, 195, 218, 239, 241 o 247 de fHbp ID 1 (por ejemplo, basándose en la numeración de fHbp ID1 madura). Una fHbp de la presente divulgación puede tener una sustitución de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a uno o más restos de aminoácidos seleccionados de 41, 60, 80, 113, 114, 117, 119, 121, 128, 130, 147, 148, 149, 178, 195, 199, 211, 221, 223, 236, 241, 247 o 248, basándose en la numeración de la ID fHbp madura 1. Una fHbp de la presente divulgación puede tener una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a uno o más restos de aminoácidos seleccionados entre 87, 109, 115, 118, 126, 138, 197, 201, 202, 203, 209, 217, 225, 235 o 245, basándose en la numeración de la fHbp ID 1 madura. Cuando la fHbp correspondiente es una variante 2 de fHbp o variante 3 (o un grupo modular correspondiente respectivo), la modificación puede introducirse en la posición 113, 119 y/o 121, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, una variante 2 de fHbp (por ejemplo, fHbp ID 77) puede contener una sustitución en una o más posiciones en 113, 119 y/o 121, así como una sustitución de serina en la posición 41, u otra sustitución adecuada en la posición 41 como se ha descrito anteriormente. Cuando la fHbp correspondiente es una variante ID 22, la modificación se puede introducir en la posición 80, 211, 218, 220, 222, 236 o 248, o cualquier combinación de las mismas.

Una variante de proteína de unión al factor H (fHbp) de la presente divulgación también puede tener una sustitución de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a uno o más restos de aminoácidos seleccionados de 60, 114, 117, 147, 148, 149, 178, 195 o 247 de fHbp ID 1. Se pueden identificar otras posiciones usando estudios de alineación de secuencia entre los aglutinantes de fH bajos y los aglutinantes de fH altos, de manera similar a la que se ha descrito anteriormente para V_A de fHbp ID 15.

Una fHbp variante de la presente divulgación puede ser una variante de fHbp ID 1 y puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes sustituciones: R41S, R41A, R130A, H119A, E218A y E239A. Como se ha tratado anteriormente, una fHbp variante de la presente divulgación puede incluir una sola sustitución de aminoácido. Una fHbp variante de la presente divulgación también puede incluir una doble sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, la fHbp variante de la presente divulgación puede incluir sustituciones en dos de R41S, R41A, R130A, H119A, E218A y E239A.

Una fHbp variante de la presente divulgación puede tener una sustitución de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a uno o más restos de aminoácidos seleccionados de 80, 211, 218, 221, 223, 236 y 248 de fHbp ID 1. Las posiciones correspondientes de las fHbp variantes son fácilmente determinables, por ejemplo, a partir de las alineaciones presentadas en las Figuras 19, 34 y 35. Como ejemplos no limitantes, una fHbp variante de la presente divulgación puede ser una variante de fHbp ID 22, y puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes sustituciones: R80A, D211A, E218A, T221A, T223A, G236I y E248A. Como se ha tratado anteriormente, una fHbp variante de la presente divulgación puede incluir una sola sustitución de aminoácido. Una fHbp variante de la presente divulgación también puede incluir una doble sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, la fHbp variante de la presente divulgación puede incluir sustituciones en dos de R80, D211, E218, T220, H222, G236 y E248. Como un ejemplo no limitante, una fHbp variante puede incluir una doble sustitución de T221A/H223A.

Una fHbp variante de la presente divulgación puede tener una sustitución de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a uno o más restos de aminoácidos seleccionados de los restos 41, 113, 119, 121 de fHbp ID 77. Como ejemplos no limitantes, una fHbp variante de la presente divulgación puede ser una variante de fHbp ID 77 y puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes sustituciones: R41S, K113A, K119A y D121A. Como se ha tratado anteriormente, una fHbp variante de la presente divulgación puede incluir una sola sustitución de aminoácido. Una fHbp variante de la presente divulgación también puede incluir una doble sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, la fHbp variante de la presente divulgación puede incluir sustituciones en dos de R41S, K113A, K119A y D121A. Como ejemplo no limitante, una fHbp variante puede incluir una doble sustitución R41S/K113A, una doble sustitución R41S/K119A o una doble sustitución R41S/D121A.

Una fHbp variante de la presente divulgación puede tener una sustitución de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a uno o más restos de aminoácidos seleccionados de los restos 113, 121, 199 y 218 de fHbp ID 28.

5 Cuando la posición R41 está sustituida con serina en la fHbp de la presente divulgación, su correspondiente fHbp puede pertenecer a uno de los grupos modulares que se muestran en la Figura 16. Por ejemplo, la fHbp correspondiente puede ser de un grupo modular I donde todos los segmentos variables son del linaje α . Los ejemplos de dichas fHbp objeto incluyen mutantes R41S de fHbp ID 1, 4, 9 y 94. En algunas realizaciones, las fHbp objeto no incluyen mutantes que no tienen una afinidad reducida hacia el fH humano con respecto a sus correspondientes fHbp. Por ejemplo, las fHbp objeto no incluyen mutantes R41S de fHbp ID 19 y 22.

fHbp quiméricas

15 Como se ha indicado anteriormente, se pueden introducir una o más modificaciones en una fHbp natural o una fHbp artificial (por ejemplo, fHbp quimérica artificial). La modificación puede abarcar una modificación en un segmento o un dominio, mientras que los otros segmentos y/o dominios pueden derivarse de cualquier fHbp (por ejemplo, una fHbp natural de un grupo de variante diferente).

20 En una fHbp descrita como aquella que tiene una arquitectura modular de segmentos V_A , V_B , V_C , V_D y V_E , la modificación se puede introducir en V_A de un linaje α (por ejemplo, R41S en V_A de fHbp ID 1) mientras que los otros segmentos de fHbp (por ejemplo, V_B , V_C , V_D y V_E) pueden derivarse independientemente de cualquier linaje, cualquier grupo de variantes o cualquier fHbp ID. En otro ejemplo, los segmentos V_A , V_C y V_E de una fHbp objeto pueden derivarse del linaje α (linaje 1), mientras que V_B y V_D pueden ser de un linaje β . Cuando la modificación es una sustitución de la arginina de la posición 41 con serina, la modificación se introduce en V_A de un progenitor α ($V_{A\alpha}$). El segmento V_A se refiere a una secuencia de aminoácidos contigua que comienza en la posición del resto 7 y termina en la posición del resto 73, en la que el número de posición corresponde a los de la secuencia de referencia, fHbp ID1.

30 Una fHbp de la presente divulgación puede contener una mutación R41S en un segmento $V_{A\alpha}$ que contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, hasta 100 % idéntica a la siguiente secuencia.

35 VAADIGAGLA DALTAPLDHK DKSLQSLTLD QSVRKNEKLK LAAQGAEKTY GNGDSLN TGKLKNDKV (SEQ ID NO: 17). La secuencia $V_{A\alpha}$ se muestra en el presente documento con la mutación R41S en negrita. Una fHbp que contiene la modificación de R41S tiene, por tanto, la mutación R41S en un segmento $V_{A\alpha}$ y puede tener los segmentos V_B , V_C , V_D y V_E , cada uno derivado independientemente de cualquier otra fHbp (por ejemplo, un linaje diferente, un grupo de variante diferente o mutantes de fHbp).

40 Una fHbp quimérica de la presente divulgación también puede describirse como aquella que tiene una modificación en el dominio N-terminal (fHbpN) de la fHbp, mientras que el dominio C-terminal (fHbpC) puede derivarse de una fHbp diferente (por ejemplo, un grupo de variante diferente o un linaje diferente). "fHbpN" se refiere a una secuencia de aminoácidos contigua que comienza en aproximadamente la posición de resto 8 y termina en aproximadamente la posición de resto 136. "fHbpC" se refiere a una secuencia de aminoácidos contigua que comienza en aproximadamente la posición de resto 141 y termina en aproximadamente la posición de resto 255. La secuencia intercalada entre fHbpN y fHbpC es un enlazador entre los dos dominios. Como ejemplo, la fHbpN de una fHbp objeto puede contener una mutación R41S en una secuencia derivada de fHbp ID 1, mientras que fHbpC se deriva de la variante 2 de fHbp o variante 3 (por ejemplo, fHbp ID 77).

50 La correspondiente fHbp quimérica puede ser de cualquier quimera artificial conocida, tal como las descritas en Beernink *et al.* (2008) *Infec. Immun.* 76:2568-2575 y el documento WO 2009/114485, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia. La quimera que contiene la modificación tiene una afinidad reducida hacia el fH humano en relación con la correspondiente fHbp quimérica, mientras que todavía se mantienen epítomos importantes para generar una respuesta bactericida, tal como las encontradas en la correspondiente fHbp quimérica. Los epítomos de fHbp que se pueden mantener en la quimera modificada incluyen los que se encuentran en la fHbp quimérica correspondiente tales como los descritos en el documento WO 2009/114485. Por ejemplo, una fHbp quimérica modificada puede contener epítomos importantes para generar la respuesta de anticuerpos bactericidas contra cepas que contengan la fHbp variante 1 (por ejemplo, epítomos del dominio N-terminal tales como los definidos por los anticuerpos monoclonales JAR 4 y/o JAR 5) y/o contra cepas que contienen la variante 2 de fHbp o 3 (por ejemplo, epítomos definidos por los anticuerpos monoclonales JAR 10, JAR 11, JAR 13 y/o JAR 36). Por ejemplo, la mutación R41S es una modificación que se puede introducir en la fHbp quimérica mostrada en las Figuras 19 y 45 para reducir la unión al fH humano mientras se mantienen los epítomos JAR 4 y JAR 5.

65 Una característica de una fHbp objeto es que cuando se administra a un hospedador (por ejemplo, mamíferos tales como ratones o seres humanos), la fHbp objeto puede generar una respuesta bactericida a un nivel comparable o superior a la respuesta bactericida generada por fHbp ID 1 u otra referencia correspondiente (por ejemplo, fHbp ID 4,

9, 22, 28, 74 o 77). Los métodos de determinación de los niveles de respuesta bactericida se conocen en la técnica y se describen en el siguiente apartado de Ejemplos. Por ejemplo, la media geométrica de los títulos bactericidas de ratones inmunizados con la fHbp objeto son al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 100 %, al menos aproximadamente 110 %, al menos aproximadamente 120 %, al menos aproximadamente 150 %, al menos aproximadamente 175 %, al menos aproximadamente 200 %, o más de 200 %, de la media geométrica de los títulos bactericidas de ratones inmunizados con fHbp ID 1. En algunos casos, la media geométrica del título bactericida de un ratón inmunizado con una fHbp objeto es al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, o más de 10 veces, superior a la media geométrica del título bactericida de un ratón de control inmunizado con fHbp ID 1.

Las fHbp objeto pueden excluir aquellas que generen una respuesta bactericida significativamente inferior a la generada por fHbp ID 1. Las fHbp objeto pueden excluir las fHbp que tengan mutaciones en ambas posiciones de resto 218 y 239 (por ejemplo, doble mutante E218A/E239A). En algunas realizaciones, las fHbp objeto abarcan solo fHbp no naturales; como tal, en algunas realizaciones, una fHbp objeto excluye fHbp naturales.

En muchos casos, una fHbp variante objeto mantiene y presenta un epítipo de configuración unido por anticuerpos bactericidas que tienen actividad bactericida hacia una o más cepas de *Neisseria meningitidis*. Por lo tanto, dichas fHbp mutantes pueden mantener un epítipo encontrado en una fHbp natural, mientras que presentan una unión reducida a fH en comparación con la afinidad de unión hacia fH de una fHbp natural. Las variantes que tienen un efecto mínimo o nulo en la configuración de fHbp de manera que la vacuna mutada genere anticuerpos bactericidas se consideran buenas candidatas como vacunas. Se puede determinar si una variante tiene un efecto sobre la configuración de fHbp de varias maneras, incluyendo la unión de anticuerpos enumerados en la Tabla 9.

Las fHbp de la presente divulgación pueden tener características adicionales, que se describen con más detalle a continuación.

Conjugados

Las fHbp objeto de la presente divulgación pueden contener uno o más elementos adicionales en el extremo N y/o C del polipéptido, tal como un polipéptido (por ejemplo, que tenga una secuencia de aminoácidos heteróloga a la fHbp objeto) y/o una molécula vehículo. Las secuencias de aminoácidos heterólogas adicionales pueden fusionarse, por ejemplo, para proporcionar una metionina N-terminal o un derivado de la misma (por ejemplo, piroglutamato) como resultado de la expresión en una célula hospedadora bacteriana (por ejemplo, *E. coli*) y/o proporcionar un polipéptido quimérico que tenga una pareja de fusión en su extremo N o extremo C. Las parejas de fusión de interés incluyen, por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), marcador His6, y similares, así como péptidos líder de otras proteínas, en particular, lipoproteínas. Las parejas de fusión pueden proporcionar características adicionales, tales como facilitar el aislamiento, la purificación, la detección y la inmunogenicidad de la fHbp objeto.

Otros elementos que pueden estar relacionados con la fHbp objeto incluyen una molécula vehículo (por ejemplo, un vehículo proteico, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH)). Se pueden unir elementos adicionales al péptido a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador flexible. Los vehículos abarcan inmunomoduladores, una molécula que modifica directa o indirectamente una respuesta inmune. Una clase específica de inmunomoduladores incluye aquellos que estimulan o ayudan en la estimulación de una respuesta inmunológica. Los ejemplos incluyen antígenos y vehículos antigénicos tales como una toxina o un derivado de la misma, incluyendo el toxoide tetánico. También se contemplan otras moléculas vehículo que facilitan la administración y/o aumentan la inmunogenicidad en un sujeto que se vaya a vacunar o tratar contra *N. meningitidis*. Las moléculas vehículo también pueden facilitar la administración a una célula o a un tejido de interés. La fracción adicional también puede ayudar a la inmunogenicidad o formar un complejo con un componente en una vacuna. Las moléculas vehículo pueden actuar como una proteína de armazón para facilitar la visualización de los epítopos en una superficie de membrana (por ejemplo, una vacuna de vesículas).

En un ejemplo, las fHbp objeto se modifican en el extremo N y/o C para incluir un ácido graso (por ejemplo, un grupo de ácido carboxílico alifático). El ácido graso puede estar unido covalentemente a la fHbp mediante un enlazador flexible. Un ejemplo de un ácido graso que puede usarse para modificar un extremo (por ejemplo, el extremo N-terminal, por ejemplo, en el extremo N) de la fHbp objeto es ácido láurico. El ácido láurico, cuando se une covalentemente a otra molécula, se denomina grupo lauroilo (por ejemplo, sulfato de lauroilo). El ácido láurico contiene doce átomos de carbono con diez grupos metileno y la fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$. Otros ácidos grasos que pueden estar unidos a los péptidos objeto incluyen ácido caprílico (10 C), ácido mirístico (14 C) y ácido palmítico (16 C). Para más detalles, véase Westerink M. A. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92:4021-4025. También se contempla en el presente documento cualquier fracción hidrófoba que pueda servir para anclar la fHbp objeto a la membrana externa bacteriana para la conjugación a un extremo N- y/o C-terminal (por ejemplo, en el extremo N) de las fHbp de la presente divulgación, en la que la fracción hidrófoba se puede conjugar opcionalmente al péptido a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador flexible, como se ha descrito en el presente documento. Por ejemplo, un pentapéptido hidrófobo FLLAV (SEQ ID NO: 18), como el descrito en Lowell G. H. *et al.* (1988) *J. Exp.*

Med. 167:658-63.

Como se ha indicado anteriormente, una forma en la que el ácido graso, así como otros elementos adicionales descritos anteriormente, se conectan a la fHbp es a través de un enlazador (por ejemplo, lauroil-Gly-Gly). Los enlazadores adecuados para su uso en la modificación de la fHbp de la presente divulgación incluyen "enlazadores flexibles". Los enlazadores adecuados se pueden seleccionar fácilmente y pueden ser de diferentes longitudes, tales como de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluyendo de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos.

Los ejemplos de enlazadores flexibles incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, (GS)_n, GSGGS_n (SEQ ID NO:19) y GGGS_n (SEQ ID NO:20), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina son de interés, ya que estos dos aminoácidos están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como un enlace neutro entre los componentes. Los polímeros de glicina son de particular interés, ya que la glicina accede significativamente más al espacio de Ramachandran (o phi-psi) que incluso la alanina, y están mucho menos restringidos que los restos con cadenas laterales más largas (véase Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11:173-142 (1992)). Los enlazadores flexibles ilustrativos incluyen, pero sin limitación, GGSG (SEQ ID NO:21), GGSGG (SEQ ID NO:22), GSGSG (SEQ ID NO:23), GSGGG (SEQ ID NO:24), GGGSG (SEQ ID NO:25), GSSSG (SEQ ID NO:26) y similares. El experto en la materia reconocerá que el diseño de una fHbp conjugada con cualquier elemento descrito anteriormente puede incluir enlazadores que sean total o parcialmente flexibles, de modo que el enlazador puede incluir un enlazador flexible, así como una o más partes que confieran una estructura menos flexible.

La fHbp nativa normalmente contiene una cisteína N-terminal a la que un resto lipídico puede unirse covalentemente. Este resto de cisteína habitualmente está lipidado en la proteína natural y puede lipidarse en las fHbp objeto desveladas en el presente documento. Por lo tanto, en las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, la referencia a "cisteína" o "C" en esta posición incluye específicamente la referencia tanto a una cisteína no modificada como a una cisteína que está lipidada (por ejemplo, debido a la modificación posterior a la traducción). Por lo tanto, la fHbp objeto puede estar lipidada o no lipidada. En la técnica, se conocen métodos de producción de proteínas lipídicas *in vitro* (véase, por ejemplo, Andersson et al. (2001) *J. Immunological Methods* 255:135-48) o *in vivo*. Por ejemplo, se ha purificado fHbp lipidada previamente a partir de la fracción de membrana de la proteína de *E. coli* mediante extracción con detergente (Fletcher et al. (2004) *Infection and Immunity* 72:2088-100), cuyo método puede adaptarse para la producción de fHbp lipidado. Las proteínas lipidadas pueden ser de interés, ya que pueden ser más inmunogénicas que la proteína soluble (véase, por ejemplo, Fletcher et al. (2004) *Infection and Immunity* 72:2088-100).

Se apreciará que las secuencias de nucleótidos que codifican las fHbp heterólogas pueden modificarse para optimizar el uso de codones con el fin de facilitar la expresión en una célula hospedadora de interés (por ejemplo, *E. coli*, *N. meningitidis*, humana (como en el caso de una vacuna a base de ADN), y similares). Los métodos de producción de secuencias optimizadas de codones son conocidos en la técnica.

Ácidos nucleicos que codifican fHbp

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica una fHbp objeto. Un ácido nucleico objeto estará presente en algunas realizaciones en una construcción de expresión recombinante. También se proporcionan células hospedadoras genéticamente modificadas que comprenden un ácido nucleico objeto.

Los polipéptidos fHbp y los ácidos nucleicos codificantes de la presente divulgación se pueden derivar de cualquier cepa de *N. meningitidis* adecuada. Como se conoce en la técnica, las cepas de *N. meningitidis* se dividen en grupos serológicos (grupos capsulares), serotipos (fenotipos PorB) y subtipos (fenotipos PorA) basándose en las reacciones con anticuerpos policlonales (Frasch C. E. y Chapman, 1973, *J. Infect. Dis.* 127: 149-154) o monoclonales que interactúan con diferentes antígenos de superficie. La agrupación capsular tradicionalmente se ha basado en variaciones inmunológicamente detectables en el polisacárido capsular, pero está siendo reemplazada por la PCR de genes que codifican enzimas específicas responsables de la biosíntesis de los polisacáridos capsulares estructuralmente diferentes. Se conocen aproximadamente 12 grupos capsulares (incluyendo A, B, C, X, Y, Z, 29-E y W-135). Las cepas de los grupos capsulares A, B, C, Y y W-135 representan casi todas las enfermedades meningocócicas. La serotipificación tradicional se ha basado en diferencias antigénicas definidas por anticuerpos monoclonales en una proteína de membrana externa denominada Porina B (PorB). Actualmente, se conocen anticuerpos que definen aproximadamente 21 serotipos (Sacchi et al., 1998, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5:348). La serosubtipificación se ha basado en variaciones antigénicas definidas por anticuerpos en una proteína de membrana externa denominada Porina A (PorA). Tanto la serotipificación como la serosubtipificación están siendo reemplazadas por la PCR y/o la secuenciación de ADN para la identificación de genes que codifican las regiones variables de PorB y PorA, respectivamente, que están asociadas con la reactividad de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, Sacchi, Lemos et al., *supra*; Urwin et al., 1998, *Epidem. and Infect.* 120:257).

Aunque se pueden usar cepas de *N. meningitidis* de cualquier grupo capsular, las cepas de *N. meningitidis* del grupo capsular B pueden ser fuentes a partir de las cuales se deriven los ácidos nucleicos codificantes de fHbp y sus dominios.

Los ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos fHbp para su uso en la construcción de las fHbp objeto contempladas en el presente documento son conocidos en la técnica. Varias fHbp y sus secuencias están disponibles en los sitios Web neisseria.org y pubmlst.org/neisseria/fHbp. También se describen ejemplos de polipéptidos fHbp, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 61/174,424, la solicitud PCT n.º PCT/US09/36577, el documento WO 2004/048404; Massignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-799; Fletcher *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100; Welsch *et al.* *J Immunol* 2004 172:5606-5615; y el documento WO 99/57280. El ácido nucleico (y las secuencias de aminoácidos) para las variantes y subvariantes de fHbp también se proporcionan en el GenBank como los números de acceso: NC_003112, ID del gen: 904318 (NCBI Ref. NP_274866), fHbp ID 1 de la cepa de *N. meningitidis* MC58; AY548371 (AAT01290.1) (de la cepa de *N. meningitidis* CU385); AY548370 (AAT01289.1) (de la cepa de *N. meningitidis* H44/76); AY548377 (AAS56920.1) fHbp ID 4 de la cepa de *N. meningitidis* M4105; AY548376 (AAS56919.1) (de la cepa de *N. meningitidis* M1390); AY548375 (AAS56918.1) (de la cepa de *N. meningitidis* NZ98/254); AY548374 (AAS56917.1) (de la cepa de *N. meningitidis* M6190); AY548373 (AAS56916.1) (de la cepa de *N. meningitidis* 4243); y AY548372 (AAS56915.1) (de la cepa de *N. meningitidis* BZ83).

Con el fin de identificar las secuencias de aminoácidos relevantes contempladas para su uso en las fHbp objeto desveladas en el presente documento, se debe observar que la fHbp inmadura incluye una secuencia líder de aproximadamente 19 restos. Además, cuando se proporciona una secuencia de aminoácidos, el experto en la materia puede visualizar fácilmente las secuencias de ácido nucleico que pueden codificar y proporcionar la expresión de un polipéptido que tenga dicha secuencia de aminoácidos.

Además de las secuencias de aminoácidos específicas y las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento, la divulgación también contempla polipéptidos y ácidos nucleicos que tienen secuencias que son al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % idénticos en secuencia a dichos ejemplos de aminoácidos y ácidos nucleicos. El término "idéntico/a" o la expresión "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polinucleótidos, o dos o más secuencias de aminoácidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idénticos en una región específica), cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima sobre una región designada, por ejemplo, una V_E o una región de al menos aproximadamente 40, 45, 50, 55, 60, 65 o más aminoácidos o nucleótidos de longitud, y pueden ser de hasta la longitud completa de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de referencia (por ejemplo, una fHbp de longitud completa). La divulgación contempla específicamente tanto polimorfismos naturales como secuencias de aminoácidos producidas sintéticamente y sus ácidos nucleicos codificantes.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de polipéptido fHbp natural o un segmento de la misma), con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un programa informático, se designan las coordenadas de secuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la/s secuencia/s de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y Altschul *et al.* (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, respectivamente. El programa informático para realizar el análisis BLAST está disponible para el público en general a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov). Otros algoritmos ilustrativos incluyen ClustalW (Higgins D., *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680), disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html.

Algunas posiciones de restos que no son idénticas difieren en sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas es aspartato y glutamato; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina.

La identidad de secuencia entre dos ácidos nucleicos también se puede describir en términos de hibridación de dos moléculas entre sí en condiciones rigurosas. Las condiciones de hibridación se seleccionan siguiendo métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual",

segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación a 50 °C o superior y 0,1 x SSC (cloruro de sodio 15 mM/citrato de sodio 1,5 mM). Otro ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es la incubación durante la noche a 42 °C en una solución: formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, seguida del lavado de los filtros en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C. Las condiciones de hibridación rigurosas son condiciones de hibridación que son al menos tan rigurosas como las condiciones representativas anteriores, donde las condiciones se consideran al menos tan rigurosas si son al menos aproximadamente un 80 % tan rigurosas, normalmente al menos un 90 % tan rigurosas como las anteriores condiciones rigurosas.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

Las fHBP de la presente divulgación se pueden producir mediante cualquier método adecuado, incluyendo métodos recombinantes y no recombinantes (por ejemplo, síntesis química). Cuando la fHbp objeto se produce usando técnicas recombinantes, los métodos pueden implicar cualquier construcción adecuada y cualquier célula hospedadora adecuada, que puede ser una célula procariota o eucariota, normalmente, una célula hospedadora bacteriana o de levadura, más normalmente, una célula bacteriana. Los métodos de introducción de material genético en células hospedadoras incluyen, por ejemplo, transformación, electroporación, conjugación, métodos de fosfato de calcio y similares. El método de transferencia se puede seleccionar para que proporcione la expresión estable del ácido nucleico que codifica la fHbp que se introduce. El ácido nucleico que codifica la fHbp se puede proporcionar como un elemento episomal heredable (por ejemplo, plásmido) o se puede integrar genómicamente.

Los vectores adecuados para la transferencia del ácido nucleico que codifica la fHbp pueden variar en composición. Los vectores integradores pueden ser plásmidos condicionalmente replicativos o suicidas, bacteriófagos, y similares. Las construcciones pueden incluir diversos elementos, incluyendo, por ejemplo, promotores, marcadores genéticos seleccionables (por ejemplo, genes que confieren resistencia a los antibióticos [por ejemplo, kanamicina, eritromicina, cloranfenicol o gentamicina]), origen de replicación (para potenciar la replicación en una célula hospedadora, por ejemplo, una célula hospedadora bacteriana), y similares. La elección del vector dependerá de varios factores tales como el tipo de célula en la que se desea la propagación y el fin de la propagación. Ciertos vectores son útiles para amplificar y fabricar grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para la expresión en células en cultivo. Otros vectores más son adecuados para la transferencia y la expresión en células en un animal entero. La elección del vector apropiado es competencia del experto en la materia. Muchos de dichos vectores se encuentran disponibles en el mercado.

En un ejemplo, el vector es un vector de expresión basado en plásmidos episomales que contienen marcadores y elementos de resistencia a fármacos seleccionables que proporcionan la replicación autónoma en diferentes células hospedadoras (por ejemplo, tanto en *E. coli* como en *N. meningitidis*). Un ejemplo de dicho "vector lanzadera" es el plásmido pFP10 (Pagotto *et al.*, *Gene* 2000, 244:13-19).

Las construcciones se pueden preparar mediante, por ejemplo, la inserción de un polinucleótido de interés en la cadena principal de una construcción, normalmente, por medio de la unión de ADN ligasa a un sitio de enzima de restricción escindido del vector. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos deseada se puede insertar mediante recombinación homóloga o recombinación específica de sitio. Por lo general, la recombinación homóloga se realiza uniendo las regiones de homología al vector en los flancos de la secuencia de nucleótidos deseada, mientras que la recombinación específica de sitio se puede realizar a través del uso de secuencias que faciliten la recombinación específica de sitio (por ejemplo, cre-lox, sitios att, etc.). Se puede añadir ácido nucleico que contenga dichas secuencias, por ejemplo, mediante la ligadura de oligonucleótidos, o mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores que comprendan tanto la región de homología como una parte de la secuencia de nucleótidos deseada.

Los vectores pueden proporcionar el mantenimiento extracromosómico en una célula hospedadora o pueden proporcionar la integración en el genoma de la célula hospedadora. Los vectores se describen ampliamente en numerosas publicaciones bien conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, "Short Protocols in Molecular Biology", (1999) F. Ausubel, *et al.*, eds., Wiley & Sons. Los vectores pueden proporcionar la expresión de los ácidos nucleicos que codifican la fHbp objeto, pueden proporcionar la propagación de los ácidos nucleicos objeto, o ambas.

Los ejemplos de vectores que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, los derivados de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido. Por ejemplo, se pueden usar vectores de plásmido tales como pBR322, pUC 19/18, pUC 118, 119 y la serie M13 mp de vectores. pET21 también es un vector de expresión que se puede usar. Los vectores de bacteriófagos pueden incluir λ gt10, λ gt11, λ gt18-23, λ ZAP/R y la serie de vectores de bacteriófago EMBL. Otros vectores que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, pJB8, pCV 103, pCV 107, pCV 108, pTM, pMCS, pNNL, pHSG274, COS202, COS203, pWE15, pWE16 y la serie de vectores charomid 9.

Para la expresión de una fHbp objeto, se puede emplear un casete de expresión. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico objeto. El vector de

expresión proporciona secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción, y puede proporcionar la expresión inducible o constitutiva, estando la región codificante operativamente enlazada bajo el control de la transcripción de la región de inicio de la transcripción, y una región de terminación de la transcripción y de la traducción. Estas regiones de control pueden ser nativas de una fHBP a partir de la que se derive la fHbp objeto, o pueden derivar de fuentes exógenas. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir, pero sin limitación, secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y parada de la transcripción, secuencias de inicio y parada de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, y pueden ser un potente promotor constitutivo (por ejemplo, T7, y similares).

En general, los vectores de expresión tienen sitios de restricción convenientes situados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifiquen las proteínas de interés. Puede haber un marcador seleccionable operativo en el hospedador de expresión para facilitar la selección de células que contengan el vector. Además, la construcción de expresión puede incluir elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener uno o dos sistemas de replicación, permitiendo así su mantenimiento en los organismos, por ejemplo, en células de mamíferos o insectos para la expresión, y en un hospedador procarionota para la clonación y la amplificación. Además, la construcción de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica, y variarán con la célula hospedadora usada.

Cabe señalar que la fHbp objeto de la presente divulgación puede comprender elementos adicionales, tales como un marcador detectable, por ejemplo, un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador de biotina, un marcador inmunológicamente detectable (por ejemplo, un marcador de HA, un marcador de poli-histidina) y similares. Se pueden proporcionar elementos adicionales de fHbp para facilitar el aislamiento (por ejemplo, un marcador de biotina, un marcador inmunológicamente detectable) a través de diversos métodos (por ejemplo, la captura de afinidad, etc.). Opcionalmente, la fHbp objeto se puede inmovilizar sobre un soporte a través de la unión covalente o no covalente.

El aislamiento y la purificación de la fHbp objeto se pueden realizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la fHbp objeto se puede aislar de un lisado de células modificadas genéticamente para expresar una fHbp, o de una mezcla de reacción sintética, mediante purificación por inmutofinidad, que, en general, implica poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-fHbp (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-fHbp, tal como un Acm JAR 5 u otro Acm JAR apropiado conocido en la técnica), lavar para eliminar el material unido no específicamente y eluir la fHbp unida específicamente. La fHBP aislada se puede purificar además mediante diálisis y otros métodos normalmente empleados en los métodos de purificación de proteínas. En un ejemplo, la fHbp se puede aislar usando métodos de cromatografía de quelatos metálicos.

Células hospedadoras

En la producción de fHbp, se puede usar cualquiera de una serie de células hospedadoras adecuadas. En general, la fHbp descrita en el presente documento se puede expresar en organismos procariotas o eucariotas, en general, en bacterias, más habitualmente *E. coli* o *Neisseria* (por ejemplo, *N. meningitidis*) de acuerdo con técnicas convencionales. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona además una célula hospedadora genéticamente modificada que contiene un ácido nucleico que codifica una fHbp objeto. Las células hospedadoras para la producción (incluyendo la producción a gran escala) de una fHbp objeto se pueden seleccionar de cualquiera de varias células hospedadoras disponibles. Los ejemplos de células hospedadoras para la expresión incluyen las de un organismo unicelular procariota o eucariota, tal como bacterias (por ejemplo, cepas de *Escherichia coli*), levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia* sp., y similares), y pueden incluir células hospedadoras derivadas originariamente de un organismo superior tal como insectos, vertebrados, particularmente mamíferos, (por ejemplo, CHO, HEK, y similares). En general, las células hospedadoras bacterianas y las levaduras son de particular interés para la producción de las fHbp objeto.

Las fHbp objeto se pueden preparar en forma esencialmente pura o esencialmente aislada (es decir, esencialmente exenta de otros polipéptidos de *Neisseria* o de células hospedadoras) o forma esencialmente aislada. La fHbp objeto está presente en una composición que está enriquecida en el polipéptido con respecto a otros componentes que pueden estar presentes (por ejemplo, otros polipéptidos u otros componentes de la célula hospedadora). Se puede proporcionar fHbp objeto purificadas de manera que el polipéptido está presente en una composición que está esencialmente exenta de otros polipéptidos expresados, por ejemplo, menos del 90 %, normalmente menos del 60 % y más normalmente menos del 50 % de la composición está constituida por otros polipéptidos expresados.

Células hospedadoras para la producción de vesículas

Cuando se va a proporcionar una fHbp objeto en una vesícula de membrana (como se explica en detalle más adelante), se modifica genéticamente una célula hospedadora de *Neisseria* para que exprese una fHbp objeto. Se puede modificar cualquiera de varias cepas de *Neisseria* sp. para producir una fHbp objeto, que, opcionalmente, produzca o se pueda modificar para que produzca otros antígenos de interés tales como PorA, que se pueden usar

en los métodos desvelados en el presente documento.

Los métodos y vectores para proporcionar la modificación genética de cepas de *Neisseria* y la expresión de un polipéptido deseado son conocidos en la técnica. En el documento WO 02/09746 y en O'Dwyer *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:6511-80, se proporcionan vectores y métodos ilustrativos. Son de particular interés los promotores potentes, en particular, los promotores potentes constitutivos. Los ejemplos de promotores incluyen los promotores de porA, porB, lbpB, tpbB, p110, hpuAB, lgtF, opa, p110, lst, hpuAB y rmp.

La especie *Neisseria* patógena o las cepas derivadas de especies de *Neisseria* patógenas, en particular, las cepas patógenas para el ser humano o las derivadas de las cepas patógenas o comensales para el ser humano, son de particular interés para su uso en la producción de vesículas de membrana. Los ejemplos de especies de *Neisseria* incluyen *N. meningitidis*, *N. flavescens*, *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica*, *N. polysaccharea*, *N. cinerea*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *N. sicca*, *N. elongata* y similares.

Las cepas de *N. meningitidis* son de particular interés para la modificación genética destinada a expresar las fHbp objeto y para su uso en la producción de vesículas. La cepa usada para la producción de vesículas se puede seleccionar de acuerdo con una serie de características diferentes que se pueden desear. Por ejemplo, la cepa se puede seleccionar de acuerdo con: un tipo de PorA deseado (un "serosubtipo", como se ha descrito anteriormente), grupo capsular, serotipo y similares; la reducción de la producción de polisacárido capsular; y similares. Por ejemplo, la cepa de producción puede producir cualquier polipéptido PorA deseado, y puede expresar uno o más polipéptidos PorA (ya sea de manera natural o mediante ingeniería genética). Los ejemplos de cepas incluyen las que producen un polipéptido PorA que confiere un serosubtipo de P1.7,16; P1.19,15; P1.7,1; P1.5,2; P1.22a,14; P1.14 ; P1.5,10; P1.7,4; P1.12,13; así como variantes de dichos polipéptidos PorA que pueden o no pueden conservar la reactividad con reactivos serológicos convencionales usados en la serosubtipificación. También son de interés los polipéptidos PorA caracterizados de acuerdo con la tipificación de regiones variables (VR) de PorA (véase, por ejemplo, Russell *et al.* (2004) *Emerging Infect Dis* 10:674-678; Sacchi C. T. *et al.* (1998) *Clin Diagn Lab Immunol* 5:845-55; Sacchi *et al.* (2000) *J. Infect Dis* 182:1169-1176). Se ha identificado un número considerable de tipos de VR distintos, que se pueden clasificar en "prototipos" de las familias VR1 y VR2. En neisseria.org/nm/typing/pora, se puede encontrar una base de datos accesible por Internet que describe dicha nomenclatura y su relación con los esquemas de tipificación anteriores. En Russell *et al.* (2004) *Emerging Infect Dis* 10:674-678, se proporcionan alineaciones de ciertos tipos de PorA VR1 y VR2.

Como alternativa o además, la cepa de producción puede ser una cepa deficiente en cápsula. Las cepas deficientes en cápsula pueden proporcionar vacunas a base de vesículas que proporcionan un menor riesgo de generar una respuesta de autoanticuerpos significativa en un sujeto a quien se administre la vacuna (por ejemplo, debido a la producción de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el ácido siálico en las superficies las células hospedadoras). "Deficiente en cápsula" o "deficiente en polisacárido capsular", como se usan en el presente documento, se refieren a un nivel de polisacárido capsular en la superficie bacteriana que es inferior al de una cepa de origen natural o, cuando la cepa se ha modificado genéticamente, que es inferior al de una cepa parental de la que se deriva la cepa deficiente en cápsula. Una cepa deficiente en cápsula incluye cepas que tienen una reducción de la producción de polisacárido capsular superficial de al menos 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más, e incluye cepas en las que el polisacárido capsular no es detectable en la superficie bacteriana (por ejemplo, mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA) de células enteras usando un anticuerpo anti-polisacárido capsular).

Las cepas deficientes en cápsula incluyen aquellas que son deficientes en cápsula debido a una modificación genética de origen natural o generadas por recombinación. Las cepas deficientes en cápsula de origen natural (véase, por ejemplo, Dolan-Livengood *et al.* (2003) *J. Infect. Dis.* 187:1616-28), así como los métodos de identificación y/o generación de cepas deficientes en cápsula (véase, por ejemplo, Fisseha *et al.* (2005) *Infect. Immun.* 73:4070-4080; Stephens *et al.* (1991) *Infect Immun* 59:4097-102; Frosch *et al.* (1990) *Mol Microbiol.* 4:1215-1218) son conocidos en la técnica.

La modificación de una célula hospedadora de *Neisseria* para reducir la producción de polisacárido capsular puede incluir la modificación de uno o más genes implicados en la síntesis de la cápsula, cuando la modificación da lugar, por ejemplo, a la reducción de los niveles de polisacárido capsular con respecto a una célula parental antes de la modificación. Dichas modificaciones genéticas pueden incluir cambios en las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos de uno o más genes de la biosíntesis de la cápsula volviendo a la cepa deficiente en cápsula (por ejemplo, debido a una o más inserciones, eliminaciones, sustituciones, y similares, en uno o más genes de la biosíntesis de la cápsula). Las cepas deficientes en cápsula pueden carecer o ser no funcionales para uno o más genes de la cápsula.

Son de particular interés las cepas que son deficientes en la biosíntesis del ácido siálico. Dichas cepas pueden proporcionar la producción de vesículas que tengan un menor riesgo de generar anticuerpos anti-ácido siálico que reaccionen de forma cruzada con los antígenos de ácido siálico humanos, y pueden proporcionar además una mejor seguridad de fabricación. Las cepas que tienen un defecto en la biosíntesis del ácido siálico (ya sea debido a una modificación de origen natural o a una modificación por ingeniería genética) pueden ser defectuosas en cualquiera

de una serie de diferentes genes de la vía de biosíntesis del ácido siálico. Son de particular interés las cepas que son defectuosas en un producto génico codificado por el gen N-acetilglucosamina-6-fosfato 2-epimerasa (conocido como synX AAF40537.1 o siaA AAA20475), siendo de particular interés las cepas que tienen este gen inactivado. Por ejemplo, en una realización, se genera una cepa deficiente en cápsula mediante la interrupción de la producción de un producto génico synX funcional (véase, por ejemplo, Swartley *et al.* (1994) *J Bacteriol.* 176:1530-4).

También se pueden generar cepas deficientes en cápsula a partir de cepas de origen natural usando técnicas no recombinantes, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos anti-capsulares bactericidas para seleccionar las cepas que reducen la producción de polisacárido capsular.

Cuando la divulgación implica el uso de dos o más cepas (por ejemplo, para producir composiciones antigénicas que contengan vesículas presentadoras de una fHbp objeto de diferentes cepas), las cepas se pueden seleccionar de manera que se diferencien en una o más características de las cepas, por ejemplo, para proporcionar vesículas que difieran en la fHbp objeto usada, PorA y similares.

Preparación de las vesículas

Las composiciones antigénicas contempladas por la presente divulgación incluyen, en general, vesículas preparadas a partir de células de *Neisseria* que expresan una fHbp objeto. Como se hace referencia en el presente documento, se entiende que el término "vesículas" engloba vesículas de membrana externa, así como microvesículas (que también se conocen como ampollas).

La composición antigénica puede contener vesículas de membrana externa (OMV) preparadas a partir de la membrana externa de una cepa cultivada de la especie *Neisseria meningitidis* modificada genéticamente para expresar una fHbp objeto. Las OMV se pueden obtener a partir de *Neisseria meningitidis* cultivada en caldo o medio de cultivo sólido, preferentemente separando las células bacterianas del medio de cultivo (por ejemplo, por filtración o por una centrifugación a baja velocidad que aglomera las células, o similares), la lisis de las células (por ejemplo, mediante la adición de detergente, choque osmótico, ultrasonidos, cavitación, homogeneización o similares) y la separación de una fracción de membrana externa de moléculas citoplasmáticas (por ejemplo, por filtración, o por precipitación diferencial o agregación de membranas externas y/o vesículas de membrana externa, o mediante métodos de separación por afinidad usando ligandos que reconocen específicamente moléculas de la membrana externa; o mediante una centrifugación de alta velocidad que aglomera las membranas externas y/o vesículas de membrana externa o similares); se pueden usar fracciones de membrana externa para producir las OMV.

La composición antigénica puede contener microvesículas (MV) (o "ampollas") que contienen las fHbp objeto, donde las MV o ampollas se liberan durante el cultivo de una cepa de *Neisseria meningitidis* modificada genéticamente para expresar una fHbp objeto. Por ejemplo, las MV se pueden obtener mediante el cultivo de una cepa de *Neisseria meningitidis* en medio de cultivo de caldo, separando las células enteras del medio de cultivo de caldo (por ejemplo, por filtración o por una centrifugación a baja velocidad que aglomera solamente las células y no las ampollas más pequeñas, o similares), y luego la recogida de las MV que están presentes en el medio de cultivo exento de células (por ejemplo, por filtración, precipitación diferencial o agregación de las MV, o por una centrifugación de alta velocidad que aglomera las ampollas, o similares). En general, las cepas para su uso en la producción de MV se pueden seleccionar basándose en la cantidad de ampollas producidas en cultivo (por ejemplo, las bacterias se pueden cultivar en un número razonable para producir las ampollas adecuadas para el aislamiento y la administración en los métodos descritos en el presente documento). Una cepa ilustrativa que produce altos niveles de ampollas se describe en la publicación PCT n.º WO 01/34642. Además de la producción de ampollas, las cepas para su uso en la producción de MV también se pueden seleccionar basándose en la producción de NspA, pudiendo ser de particular interés las cepas que produzcan niveles más altos de NspA (para consultar ejemplos de cepas de *N. meningitidis* que tienen diferentes niveles de producción de NspA, véase, por ejemplo, Moe *et al.* (1999) *Infect. Immun.* 67: 5664). Otras cepas de interés para su uso en la producción de ampollas incluyen cepas que tienen un gen GN33 inactivado que codifica una lipoproteína necesaria para la separación celular, la arquitectura de la membrana y la virulencia (véase, por ejemplo, Adu-Bobie *et al.* (2004) *Infect Immun.* 72:1914-1919).

Las composiciones antigénicas de la presente divulgación pueden comprender vesículas de una cepa, o de 2, 3, 4, 5 o más cepas, pudiendo ser las cepas homólogas o heterólogas, normalmente, heterólogas, entre sí. Por ejemplo, las cepas pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a PorA y/o la fHbp de la que se obtiene la fHbp objeto. Las vesículas se pueden preparar a partir de cepas que expresen más de una fHbp objeto (por ejemplo, 1, 2, 3 o más fHbp objeto) que puede estar compuesta de secuencias de aminoácidos de diferentes variantes (v.1, v.2 o v.3) o subvariantes (por ejemplo, una subvariante de v.1, v.2 o v.3).

Las composiciones antigénicas pueden comprender una mezcla de OMV y MV que presentan las mismas fHbp objeto o diferentes, pudiendo presentar las fHbp objeto opcionalmente epítopos de diferentes combinaciones de variantes y/o subvariantes de fHBP, y pudiendo proceder las OMV y/o MV de las mismas o diferentes cepas. Se pueden administrar vesículas de diferentes cepas como una mezcla, o se pueden administrar en serie.

Cuando se desee (por ejemplo, cuando las cepas usadas para producir vesículas están asociadas con endotoxina o niveles particularmente altos de endotoxina), las vesículas se tratan opcionalmente para reducir la endotoxina, por ejemplo, para reducir la toxicidad tras la administración. Aunque es menos deseable, como se tratará a continuación, la reducción de endotoxina se puede realizar mediante extracción con un detergente adecuado (por ejemplo, BRIJ-96, desoxicolato de sodio, lauroilsarcosinato de sodio, Empigen BB, Triton X-100, TWEEN 20 (monolaurato de polioxietileno de sorbitán), TWEEN 80, a una concentración del 0,1 al 10 %, preferentemente del 0,5 al 2 %, y SDS). Cuando se usa la extracción con detergente, es preferible usar un detergente que no sea desoxicolato.

Las vesículas de las composiciones antigénicas se pueden preparar sin detergente, por ejemplo, sin el uso de desoxicolato. Aunque el tratamiento con detergente es útil para eliminar la actividad de la endotoxina, puede agotar la lipoproteína fHBP nativa y/o fHbp objeto (incluyendo la fHbp lipídada) mediante la extracción durante la producción de vesículas. Por lo tanto, puede ser particularmente deseable reducir la actividad de la endotoxina usando tecnología que no requiera un detergente. En un enfoque, se usan cepas que producen niveles relativamente bajos de endotoxina (lipopolisacárido, LPS) para evitar la necesidad de eliminar la endotoxina del preparado final antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, las vesículas se pueden preparar a partir de mutantes de *Neisseria* en los que se reduzcan o eliminen los lipooligosacáridos u otros antígenos que puedan no ser deseados en una vacuna (por ejemplo, Rmp).

Las vesículas se pueden preparar a partir de cepas de *N. meningitidis* que contengan modificaciones genéticas que den lugar a una actividad tóxica reducida o no detectable del lípido A. Por ejemplo, dicha cepa se puede modificar genéticamente en la biosíntesis del lípido A (Steehgs *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:4988-93; van der Ley *et al.* (2001) *Infect Immun* 69:5981-90; Steeghs *et al.* (2004) *J Endotoxin Res* 10:113-9; Fisshe *et al.*, (2005) *Infect Immun* 73:4070). Las composiciones inmunogénicas se pueden desintoxicar mediante la modificación de LPS, tal como la regulación por disminución y/o la inactivación de las enzimas codificadas por lpxL1 o lpxL2, respectivamente. La producción de un lípido A penta-acilado creado en mutantes lpxL1 indica que la enzima codificada por lpxL1 añade el C12 al C14 3-OH enlazado en N en la posición 2' de GlcN II. La principal especie de lípido A que se encuentra en los mutantes lpxL2 está tetra-acilada, lo que indica que la enzima codificada por lpxL2 añade el otro C12, es decir, C14 3-OH enlazado en N en la posición 2 de GlcN I. Las mutaciones que reducen (o anulan) la expresión de estos genes (o reducen o anulan la actividad de los productos de estos genes) producen una actividad tóxica modificada del lípido A (van der Ley *et al.* (2001) *Infect Immun* 69:5981-90). El lípido A tetra-acilado (mutante lpxL2) y pentaacilado (mutante lpxL1) son menos tóxicos que los lípidos A de tipo silvestre. Las mutaciones en el gen que codifica la lípido A 4'-quinasa (lpxK) también reducen la actividad tóxica del lípido A. Son de particular interés para su uso en la producción de vesículas (por ejemplo, MV o OMV) las cepas de *N. meningitidis* modificadas genéticamente para proporcionar la reducción o anulación de proteína codificada por lpxL1 funcional detectable, por ejemplo, cuando la bacteria de *Neisseria* (por ejemplo, cepa de *N. meningitidis*) se modifica genéticamente para proporcionar una reducción o anulación de un producto génico del gen lpxL1. Por ejemplo, la bacteria *Neisseria* puede modificarse genéticamente para tener un gen inactivado de lpxL1, por ejemplo, cuando el gen lpxL1 se rompe. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º 2009/0035328. La bacteria *Neisseria* puede modificarse genéticamente para proporcionar una actividad reducida o nula de un producto génico del gen lpxL2. La bacteria *Neisseria* puede modificarse genéticamente para proporcionar una actividad reducida o nula de un producto génico del gen lpxL1 y del gen lpxL2. Dichas vesículas proporcionan una toxicidad reducida en comparación con las cepas de *N. meningitidis* que son de tipo silvestre para la producción de LPS, al tiempo que conservan la inmunogenicidad de la fHbp objeto.

La actividad tóxica de LPS también puede alterarse mediante la introducción de mutaciones en genes/locus implicados en la resistencia a la polimixina B (dicha resistencia se ha correlacionado con la adición de aminoarabinosa en el fosfato 4' del lípido A). Estos genes/locus podrían ser pmRE, que codifica una UDP-glucosa deshidrogenasa, o una región de genes de resistencia a péptidos antimicrobianos comunes a muchas enterobacterias que podrían estar implicadas en la síntesis y transferencia de aminoarabinosa. El gen pmrF, que está presente en esta región codifica una dolicol-fosfato manosil transferasa (Gunn J. S., Kheng, B. L., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S. I. 1998. *Mol. Microbiol.* 27: 1171-1182).

Las mutaciones en el sistema regulador PhoP-PhoQ, que es un sistema regulador de dos componentes de fosfo-transmisión (por ejemplo, fenotipo constitutivo PhoP, PhoPc), o condiciones ambientales o de cultivo bajas en Mg⁺⁺ (que activan el sistema regulador PhoP-PhoQ) conducen a la adición de aminoarabinosa en fosfato 4' y 2-hidroximiristato que reemplaza el miristato (hidroxilación de miristato). Este lípido A modificado muestra una capacidad reducida para estimular la expresión de E-selectina por las células endoteliales humanas y la secreción de TNF de monocitos humanos.

Las cepas resistentes a la polimixina B también son adecuadas para su uso, ya que se ha demostrado que estas cepas tienen una toxicidad de LPS reducida (véase, por ejemplo, van der Ley *et al.* (1994) en: "Proceedings of the ninth international pathogenic *Neisseria* conference". The Guildhall, Winchester, Inglaterra). Como alternativa, pueden añadirse péptidos sintéticos que imiten la actividad de unión de la polimixina B a las composiciones antigénicas para reducir la actividad tóxica de LPS (véase, por ejemplo, Rustici *et al.* (1993) *Science* 259:361-365; Porro *et al.* (1998) *Prog Clin Biol Res.* 397:315-25).

La endotoxina también se puede reducir mediante la selección de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, el cultivo de la cepa en un medio de crecimiento que contenga de 0,1 mg a 100 mg de aminoarabinosa por litro de medio proporciona una reducción de la toxicidad de los lípidos (véase, por ejemplo, el documento WO 02/097646).

5 **COMPOSICIONES Y FORMULACIONES**

El término "composiciones", y las expresiones "composición de antígeno", "composición antigénica" o "composición inmunogénica" se usan en el presente documento por una cuestión de conveniencia para referirse genéricamente a composiciones que comprenden una fHbp objeto según lo desvelado en el presente documento, fHbp objeto que puede estar opcionalmente conjugada para potenciar más la inmunogenidad. Las composiciones útiles para generar anticuerpos, en particular, anticuerpos contra *Neisseria meningitidis*, por ejemplo, anticuerpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis*, en un ser humano son contempladas específicamente por la presente divulgación. Las composiciones antigénicas pueden contener 1, 2 o más fHbp objeto diferentes. Cuando hay más de un tipo de fHbp, cada fHbp objeto puede presentar epítomos de diferentes combinaciones de variantes y/o subvariantes de fHbp.

Las composiciones antigénicas contienen una cantidad inmunológicamente eficaz de una fHbp objeto, y pueden incluir además otros componentes compatibles, según sea necesario. Las composiciones de la presente divulgación pueden contener fHbp que son aglutinantes de fH bajos. Los aglutinantes bajos de fH en las composiciones objeto engloban cualquier fHbp descrita anteriormente, tal como fHbp no natural o natural (por ejemplo, fHbp ID 14 y/o fHbp ID 15). La composición contiene una o más fHbp, en la que al menos una fHbp es un aglutinante de fH bajo. Cuando hay más de una fHbp en una composición, cada fHbp puede ser diferente (por ejemplo, en secuencias de aminoácidos y/o conjugación).

Las composiciones inmunogénicas contempladas por la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, composiciones que comprenden:

1) una fHbp no natural (por ejemplo, una fHbp no natural que tiene una afinidad inferior por el fH humano que fHbp ID 1); y

2) una fHbp (por ejemplo, una fHbp no natural, por ejemplo, una fHbp no natural que tiene una afinidad inferior por fH que fHbp ID 1) y NspA;

donde la fHbp y/o NspA pueden proporcionarse como proteínas recombinantes y/o en una composición a base de vesículas (por ejemplo, OMV). Se ha de observar que cuando la composición incluye tanto NspA como una fHbp, la actividad bactericida de los anticuerpos generada por la administración de la composición puede deberse a la cooperación de los anticuerpos contra uno o ambos antígenos. Los ejemplos de composiciones inmunogénicas proporcionadas por la presente divulgación incluyen:

a) una composición inmunogénica que comprende una variante de fHbp no natural como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, a, donde la fHbp no natural genera una respuesta de anticuerpo bactericida contra al menos una cepa de *Neisseria meningitidis*);

b) una composición inmunogénica que comprende una variante de fHbp no natural como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, una fHbp no natural que tiene una afinidad inferior por fH humano que fHbp ID 1); y una proteína NspA recombinante;

c) una composición inmunogénica que comprende una fHbp aislada que comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con fHbp ID 14 o fHbp ID 15, donde la fHbp tiene menor afinidad por el factor humano H (fH) que la fHbp ID 1;

d) una composición inmunogénica que comprende una fHbp aislada que comprende al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con fHbp ID 14 o fHbp ID 15, donde la fHbp tiene menor afinidad por el factor humano H (fH) que la fHbp ID 1; y una proteína NspA recombinante;

e) una composición inmunogénica que comprende una OMV nativa obtenida de una célula hospedadora de *Neisseria* genéticamente modificada que está genéticamente modificada con un ácido nucleico que codifica una fHbp variante no natural como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, una fHbp no natural que tiene afinidad inferior hacia el fH humano que fHbp ID 1), de modo que la fHbp no natural codificada sea producido por la célula hospedadora modificada genéticamente, donde la OMV comprende la fHbp no natural codificada; y

f) una composición inmunogénica que comprende una OMV nativa obtenida de una célula hospedadora de *Neisseria* genéticamente modificada que está genéticamente modificada con un ácido nucleico que codifica una variante de fHbp no natural como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, una fHbp no natural que tiene afinidad inferior por el fH humano que fHbp ID 1, de modo que la fHbp no natural codificada es producida por la célula hospedadora genéticamente modificada, donde la OMV comprende la fHbp no natural codificada; y donde la célula hospedadora de *Neisseria* también produce niveles más altos de NspA, de modo que la OMV también comprende NspA. Por ejemplo, la célula hospedadora de *Neisseria* puede estar genéticamente modificada para aumentar la expresión de NspA.

La expresión "cantidad inmunológicamente eficaz" pretende significar que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una sola dosis, como parte de una serie de las mismas o diferentes composiciones antigénicas, es

eficaz para generar una respuesta de anticuerpos eficaz para el tratamiento o la prevención de un síntoma de, o de una enfermedad causada por, por ejemplo, la infección por *Neisseria*, en particular, *N. meningitidis*, más en particular, *N. meningitidis* del grupo B. Esta cantidad varía dependiendo del estado de salud y del estado físico del individuo que se vaya a tratar, de la edad, de la capacidad del sistema inmune del individuo para producir anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación que el médico tratante realice de la situación médica y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse mediante ensayos rutinarios.

Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos NspA son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento WO 96/29412; y Martin *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* 185:1173; Número de acceso de GenBank U52066; y Número de acceso de GenBank AAD53286. Un "polipéptido NspA" puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un tramo contiguo de aproximadamente 75 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, de aproximadamente 100 aminoácidos a aproximadamente 150 aminoácidos o de aproximadamente 150 aminoácidos a aproximadamente 174 aminoácidos, de la secuencia de aminoácidos representada en Figura 44. Un "polipéptido NspA" puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un tramo contiguo de aproximadamente 75 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, o de aproximadamente 100 aminoácidos a aproximadamente 155 aminoácidos, de aminoácidos 20 a 174 de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 44. En algunos casos, el polipéptido NspA carece de una secuencia señal; en otros casos (por ejemplo, para la expresión en una célula hospedadora), el polipéptido NspA incluye una secuencia señal.

La pauta de dosificación puede ser un programa de monodosis o un programa de multidosis (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo) con una forma de dosificación unitaria de la composición antigénica administrada en diferentes momentos. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de las composiciones antigénicas de la presente divulgación en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, composiciones que se proporcionan en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable). La composición antigénica se puede administrar en combinación con otros agentes inmunorreguladores.

Las composiciones antigénicas se pueden proporcionar en un excipiente farmacéuticamente aceptable, que puede ser una solución tal como una solución acuosa estéril, normalmente, una solución salina, o que se pueden proporcionar en forma de polvo. Si se desea, dichos excipientes pueden ser esencialmente inertes.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende una fHbp objeto presente en una vesícula. En algunas realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende una fHbp objeto presente en una MV. En algunas realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende una fHbp objeto presente en una OMV. En algunas realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende una mezcla de MV y OMV que comprende una fHbp objeto. Las vesículas tales como MV y OMV, se han descrito anteriormente.

Las composiciones antigénicas pueden contener además un adyuvante. Los ejemplos de adyuvantes adecuados conocidos que se pueden usar en los seres humanos incluyen, pero sin limitarse necesariamente a, alumbre, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, MF59 (escualeno al 4,3 % p/v, Tween 80™ al 0,5 % p/v, Span 85 al 0,5 % p/v), ácido nucleico que contiene CpG (donde la citosina no está metilada), QS21, MPL, 3DMPL, extractos de Aquilla, ISCOMS, mutantes LT/CT, micropartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG), Quil A, interleucinas, y similares. Para los animales experimentales, se puede usar de Freund, N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)etilamina (CGP 19835A, denominado MTPPE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A monofosforílico, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80. La eficacia de un adyuvante se puede determinar midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el antígeno inmunogénico o epítipo antigénico del mismo.

Los adyuvantes adicionales ilustrativos para potenciar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación: (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59™ (documento WO 90/14837; Capítulo 10 de "Vaccine design: the subunit and adjuvant approach", eds. Powell & Newman, Plenum Press, 1995), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador; (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado con pluronic al 5 % y thr-MDP bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometido a movimientos vorticiales para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula; y (c) sistema de adyuvantes RIBI™ (RAS),

(Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana, tales como monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (2) se pueden usar adyuvantes de saponina tales como QS21 o Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, Mass.) o partículas generadas a partir de los mismos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), ISCOM que pueden carecer de un detergente adicional, por ejemplo, el documento WO 00/07621; (3) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (4) citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) monofosforil-lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL), por ejemplo, los documentos GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente, en ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos neumocócicos, por ejemplo, documento WO 00/56358; (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, por ejemplo, documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (Krieg *Vaccine* 2000, 19, 618-622; Krieg *Curr Opin Mol Ther* 2001 3:15-24; Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 810-876; Chu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224; Krieg *et al.*, *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, *Cell Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; y Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906; solicitudes de patente internacional WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 and WO 98/52581, es decir, que contiene al menos un dinucleótido CG, donde la citosina está desmetilada; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo, el documento WO 99/52549; (9) un tensioactivo de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO 01/21207) o un tensioactivo de polioxietilenalquiléter o polioxietilenalquiléster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO 01/21152); (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) (documento WO 00/62800); (11) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica, por ejemplo, el documento WO 00/23105; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo, el documento WO 99/11241; (13) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IM2 (opcionalmente + un estero) por ejemplo, el documento WO 98/57659; (14) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-25-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarninil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (MTP-PE), etc. Son de particular interés los adyuvantes adecuados para la administración a un ser humano.

Las composiciones antigénicas pueden comprender otros componentes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requieran para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares.

La concentración de la fHbp objeto de una formulación puede variar ampliamente (por ejemplo, de menos del aproximadamente 0,1 %, normalmente a o al menos aproximadamente 2 % hasta tanto como del 20 % al 50 % o más en peso) y, normalmente, se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades y factores basados en el paciente de acuerdo con el modo concreto de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

Las formulaciones que contienen fHbp se pueden proporcionar en forma de una solución, suspensión, comprimido, píldora, cápsula, polvo, gel, crema, loción, pomada, aerosol o similares. Se reconoce que la administración oral puede requerir proteger las composiciones de la digestión. Por lo general, esto se realiza bien mediante la asociación de la composición con un agente que la vuelva resistente a la hidrólisis ácida y enzimática o mediante el envasado de la composición en un vehículo apropiadamente resistente. Los medios de protección de la digestión son bien conocidos en la técnica.

Las formulaciones que contienen fHbp también se pueden proporcionar para aumentar la semivida en suero de la fHbp tras la administración. Por ejemplo, cuando las fHbp aisladas se formulan para inyección, la fHbp se puede proporcionar en una formulación de liposomas, preparada en forma de coloide, u otras técnicas convencionales para prolongar la semivida en suero. Se dispone de varios métodos de preparación de liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980), las patentes de EE.UU. N.º 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. Los preparados también se pueden proporcionar en formas de liberación lenta o de liberación controlada.

INMUNIZACIÓN

La presente divulgación proporciona un método de inducción de una respuesta inmune hacia al menos una cepa de *Neisseria* en un hospedador mamífero. En general, los métodos implican administrar a un individuo que lo necesita una cantidad eficaz de una composición inmunogénica objeto.

En general, las composiciones antigénicas que contienen fHbp se administran a un sujeto humano que se encuentre en riesgo de adquirir una enfermedad producida por *Neisseria* para prevenir o al menos detener parcialmente el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para el uso terapéutico dependerán, por ejemplo, de la composición antigénica, la manera de administración, el peso y el estado general de salud del paciente, y el juicio del médico que las prescribe. Se pueden administrar monodosis y multidoses de las composiciones antigénicas dependiendo de la dosis, y de la frecuencia requerida y tolerada por el paciente, y la vía de administración.

En general, las composiciones antigénicas que contienen fHbp se administran en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmune, en particular, una respuesta inmune humoral, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos bactericidas en el hospedador. Como se ha indicado anteriormente, las cantidades para la inmunización variarán y, en general, pueden variar de aproximadamente 1 mg a 100 mg por cada paciente de 70 kg, normalmente, de 5 mg a 50 mg/70 kg. Pueden ser adecuadas dosis sustancialmente superiores (por ejemplo, de 10 mg a 100 mg o superiores) en las vías de administración oral, nasal o tópica. A la administración inicial, le puede seguir la inmunización de refuerzo de la misma o diferente composición antigénica que contiene fHbp. Normalmente, la vacunación implica al menos un refuerzo, más habitualmente dos refuerzos.

En general, la inmunización se puede realizar mediante la administración por cualquier vía adecuada, incluyendo la administración de la composición por vía oral, nasal, nasofaríngea, parenteral, entérica, gástrica, tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, en comprimido, en forma sólida, en polvo, en forma líquida, en forma de aerosol, local o sistémicamente, con o sin excipientes añadidos. Los métodos reales de preparación de composiciones que se pueden administrar por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia, y se describen más detalladamente en publicaciones tales como "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

La respuesta inmune anti-fHbp se puede evaluar mediante métodos conocidos (por ejemplo, mediante la obtención de suero del individuo antes y después de la inmunización inicial, y la demostración de un cambio en el estado inmune del individuo, por ejemplo, un ensayo de inmunoprecipitación o un ELISA, o un ensayo bactericida o una transferencia Western o ensayo de citometría de flujo, o similar).

Las composiciones antigénicas se pueden administrar a un sujeto humano que no haya sido tratado previamente inmunológicamente con respecto a *Neisseria meningitidis*. En una realización particular, el sujeto es un niño humano de aproximadamente cinco años o menor, y preferentemente de aproximadamente dos años o menor, y las composiciones antigénicas se administran en uno o más de los siguientes momentos: a las dos semanas, al mes, a los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 meses, o a un año o 15, 18 o 21 meses del nacimiento, o a los 2, 3, 4 o 5 años de edad.

En general, puede ser deseable iniciar la inmunización antes del primer signo de síntoma de la enfermedad, o en el primer signo de una posible exposición o exposición real a la infección o la enfermedad (por ejemplo, debido a la exposición o infección por *Neisseria*).

MÉTODOS DE DETECCIÓN

En un ejemplo, un método de evaluación de la eficacia de una fHbp objeto en una composición de vacuna implica: (a) inmunizar un animal hospedador (por ejemplo, un animal hospedador mamífero no humano, tal como un roedor, por ejemplo, un ratón) con una composición que comprenda una fHbp de la presente divulgación; y (b) medir los niveles de anticuerpos bactericidas en el hospedador. El presente método también puede incluir evaluar la susceptibilidad de un animal hospedador a quien se ha administrado una vacuna que comprende una fHbp objeto contra un patógeno bacteriano.

En otro ejemplo, el método puede implicar la fabricación e identificación de anticuerpos generados por la fHbp objeto. El método implica aislar anticuerpos del animal hospedador que tienen afinidad de unión hacia fHbp, poniendo en contacto una célula bacteriana con los anticuerpos aislados; y evaluar la unión del anticuerpo a la célula bacteriana. Las etapas adicionales pueden incluir evaluar la unión competitiva del anticuerpo a fHbp con factor H humano; evaluar la actividad bactericida contra un patógeno bacteriano cuando el anticuerpo se administra a un animal que ha contraído el patógeno bacteriano. En algunas realizaciones, el anticuerpo está en una población de anticuerpos, y el método puede comprender además: aislar uno o más anticuerpos de la población de anticuerpos que se unen a la célula bacteriana. Un aspecto destacado es el anticuerpo aislado que es bactericida contra la célula bacteriana, que puede incluir, por ejemplo, actividad bactericida mediada por complemento y/o actividad opsonofagocítica capaz de disminuir la viabilidad de las bacterias en sangre humana.

Los patógenos bacterianos de particular interés son *N. meningitidis* de todos y cada uno de los grupos de variantes, de diversos grupos capsulares, tales como *N. meningitidis* de Serogrupo B, *N. meningitidis* de Serogrupo C, *N. meningitidis* de Serogrupo X, *N. meningitidis* de Serogrupo Y, *N. meningitidis* de Serogrupo W-135 y similares.

5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE UNA RESPUESTA A UNA FHBP

La presente divulgación proporciona métodos para determinar la probabilidad de que una fHbp genere una respuesta bactericida en un individuo; y métodos para evaluar una fHbp variante con el fin de determinar su idoneidad para su inclusión en una composición inmunogénica.

10 Determinación de la probabilidad de que una fHbp genere una respuesta bactericida

La presente divulgación proporciona un método de determinación de la probabilidad de que una fHbp (por ejemplo, una fHbp presente en una vacuna de *Neisseria*) genere una respuesta bactericida en un individuo hacia al menos una cepa de *Neisseria meningitidis*. En general, el método implica determinar la capacidad del anticuerpo, presente en el suero obtenido de un individuo que ha sido inmunizado con una fHbp, para inhibir la unión a fH a fHbp. La inhibición de la unión a fH a fHbp por el anticuerpo a un nivel que es al menos aproximadamente 10 % superior, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente del doble, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces o más de 100 veces superior al nivel de inhibición de fH a fHbp por un anticuerpo de control que inhibe la unión a fH a fHbp, pero que no genera una respuesta bactericida, indica que es probable que la fHbp genere una respuesta bactericida hacia al menos una cepa de *Neisseria meningitidis*. En algunas realizaciones, la fHbp es una fHbp no natural que tiene una afinidad inferior por el factor humano H (fH) que la fHbp ID1, como se ha descrito anteriormente.

El grado de inhibición de la unión a fH a fHbp por el anticuerpo generado hacia una variante de fHbp puede determinarse usando un ensayo como se describe en el presente documento, o cualquier otro ensayo conocido. Por ejemplo, fH y/o fHbp pueden comprender un marcador detectable, y la inhibición de la unión a fH/fHbp puede evaluarse detectando la cantidad de componente marcado presente en un complejo de fH/fHbp y/o detectando la cantidad de marcador presente en fH libre y/o fHbp libre (por ejemplo, fH o fHbp que no está en un complejo de fH/fHbp).

En un ejemplo, los ensayos de evaluación de la unión a fH a una fHbp implican el uso de fHbp inmovilizada en un soporte (por ejemplo, fHbp inmovilizada en el pocillo de una placa de microtitulación). Se añade una mezcla de una concentración fija de fH humano con diluciones de los anticuerpos de ensayo (por ejemplo, antisuero, por ejemplo, de un animal de ensayo humano o no humano (por ejemplo, de ratón) que ha recibido una dosis que genera anticuerpos de una composición inmunogénica) a los pocillos y se incuban durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión del anticuerpo. Tras lavar los pocillos, se detecta el fH unido con un antisuero anti-fH específico (por ejemplo, de cabra o burro) que contiene un componente marcado, o un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, antisuero de conejo anti-cabra o anti-burro). El porcentaje de inhibición de fH unido puede calcularse mediante la cantidad de fH unido en ausencia de anticuerpo humano o de ratón añadido.

En otra variación de dichos ensayos, la unión a fH a bacterias vivas en presencia o ausencia de antisueros de ensayo se evalúa mediante citometría de flujo. Las células bacterianas se incuban con una concentración fija de fH (por ejemplo, fH marcado detectablemente) y diferentes diluciones de sueros de ensayo que contienen anticuerpo. Se lavan las bacterias y se detecta el fH unido (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente).

Por lo tanto, la capacidad del antisuero de un individuo inmunizado con una fHbp para inhibir la unión a fH/fHbp sirve como un sustituto para evaluar directamente la actividad bactericida del antisuero. Un método de la presente divulgación para determinar la probabilidad de que una fHbp genere una respuesta bactericida en un individuo puede proporcionar información a un médico u otro personal médico sobre si una determinada composición inmunogénica ha sido eficaz para generar una respuesta bactericida en un individuo.

Los individuos inmunizados pueden tener un título de anticuerpos IgG anti-fHbp en suero similar medido mediante ELISA. Los antisueros que proporcionan una mejor inhibición global de la unión a fH son indicativos de una respuesta de anticuerpos anti-fHbp más eficaz y de mejor calidad, y conferirán una mayor protección. Así pues, por ejemplo, si se compara la respuesta de anticuerpos anti-*Neisseria* en dos individuos (por los anticuerpos anti-fHbp, es decir, una dilución de suero de 1:10.000 inhibe en comparación con una dilución de 1:3000 por el otro individuo), el individuo con la actividad inhibidora superior tiene un anticuerpo anti-fHbp de mejor calidad que conferirá una mayor protección. El ensayo de inhibición de fH es, por lo tanto, un sustituto de los ensayos de títulos bactericidas mediados por complemento, ensayos de títulos bactericidas mediados por complemento que, en general, requieren más tiempo y son más difíciles de medir que la inhibición de fH.

Evaluación de una variante de fHbp

La presente divulgación proporciona métodos de evaluación o predicción de la probabilidad de que una variante de fHbp sea eficaz para generar una respuesta de anticuerpo bactericida en un individuo. Los métodos generalmente implican evaluar la capacidad del anticuerpo específico de la variante de fHbp para inhibir la unión a fH a fHbp. La fuerza de la inhibición de la unión a fH a fHbp por el anticuerpo generado inmunizando con una variante de fHbp es directamente proporcional a la actividad bactericida del anticuerpo generado por la variante de fHbp. Una variante de fHbp que genera anticuerpos que inhiben la unión a fH a fHbp a una alta dilución de suero se considera un candidato adecuado como vacuna para generar protección contra una o más cepas de *Neisseria*.

Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un método de determinación de la probabilidad de que una fHbp no natural que tenga una afinidad inferior por fH humano que fHbp ID 1 genere anticuerpos bactericidas en un individuo hacia al menos una cepa de *Neisseria meningitidis*. En general, el método implica determinar la capacidad de un anticuerpo generado en un animal no humano de ensayo hacia la fHbp no natural para inhibir la unión a fH a fHbp. La inhibición de la unión a fH a fHbp por el anticuerpo generado por la fHbp no natural a un nivel que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, o más de 100 veces, superior al nivel de inhibición de fH a fHbp por un anticuerpo generado en el animal no humano de ensayo hacia fHbp ID 1 indica que es probable que la fHbp no natural genere una respuesta bactericida hacia al menos una cepa de *Neisseria meningitidis*.

Los animales no humanos de ensayo adecuados incluyen, por ejemplo, ratones, ratas, conejos y similares. El grado de inhibición de la unión a fH a fHbp por el anticuerpo generado hacia una variante de fHbp puede determinarse usando un ensayo como el descrito en el presente documento, o cualquier otro ensayo conocido. La actividad bactericida de un anticuerpo se determina fácilmente usando un ensayo como el descrito en el presente documento, o cualquier otro ensayo conocido.

Un método objeto de determinación de la probabilidad de que una fHbp no natural dada que tiene una afinidad inferior hacia el fH humano que la fHbp ID 1 generará anticuerpos bactericidas en un individuo hacia al menos una cepa de *Neisseria meningitidis* es útil para identificar inmunógenos adecuados (y/o eliminar los inmunógenos inadecuados), por ejemplo, en el curso del desarrollo de una vacuna.

Ejemplos

VISIÓN DE CONJUNTO DE LOS EJEMPLOS

El factor H (fH) está presente a altas concentraciones en el suero (~200 a 800 µg/ml). La unión a fH a fHbp es específica del fH humano (Granoff *et al.* (2009) *Infect Immun* 77:764). Una implicación es que cuando los seres humanos son inmunizados con fHbp, la molécula puede formar un complejo con fH. Por el contrario, cuando se inmunizan primates no humanos u otros animales experimentales, el antígeno se presenta al sistema inmune sin fH unido. En los seres humanos, la presencia de fH en un complejo con fHbp puede afectar a la inmunogenicidad de fHbp (por ejemplo, cubriendo epítomos y afectando a la presentación del antígeno).

En el presente documento, se presente pruebas de que la presencia de fH humano disminuye las respuestas de anticuerpos protectores a una vacuna fHbp que se une a fH. Además, aunque ciertas vacunas mutantes con una o dos sustituciones de aminoácidos no se unen a fH (por ejemplo, E218A y/o E239A), las mutaciones específicas usadas para alterar la molécula generaron cambios que disminuyeron la capacidad de las vacunas para generar anticuerpos bactericidas en suero. Se identificaron mutantes de aminoácidos individuales adicionales (por ejemplo, mutantes R41S o R41A de fHbp ID1; mutantes R41S de fHbp ID 4, 9, 74 o fHbp I quimérica; R130A de fHbp ID 1; mutantes R80A, D211A, E218A, E248A o G236I de fHbp ID 22; un mutante T220A/H222A de fHbp ID 22; mutantes R41S/K113A, R41S/K119A, R41S/D121A o R41S/K113A/D121A de fHbp ID 77; y un mutante K199A o E218A de fHbp ID 28) que tenían una unión reducida a fH. Una vacuna de fHbp con la mutación R41S no tuvo una capacidad reducida para generar anticuerpos bactericidas y en presencia de fH humano dio respuestas de anticuerpos protectores más elevadas que la vacuna de fHbp ID1 de tipo silvestre que se unió a fH. Otras mutaciones tales como K241E de fHbp ID 1 o E241K en fHbp ID 15, que a partir de la estructura cristalina de fHbp ID 1 se predice que estarán en contacto con fH, no tuvieron efecto sobre la unión a fH. Además, la mutación R41S, que disminuyó la unión a fH en fHbp ID 1, 4, 9 y 74, no disminuyó la unión a fH en fHbp ID 22 o 77. Las mutaciones (tales como R41S en fHbp ID1 y otras mutaciones tratadas a continuación) que disminuyen la unión a fH, pero tienen un efecto mínimo o nulo sobre la configuración de fHbp de modo que la vacuna mutada genere anticuerpos bactericidas pueden dar lugar a candidatos de vacunas superiores. Por lo tanto, se proporcionan variantes de fHbp que mantienen y presentan un epítipo conformacional unido por anticuerpos bactericidas que tienen actividad bactericida hacia una o más cepas de *Neisseria meningitidis*.

Los detalles de los estudios que condujeron a este descubrimiento se detallan a continuación.

Materiales y métodos

Modelo de ratón transgénico de fH humano. Se clonó el ADNc del complemento humano fH de 3,9 kpb (cfh) en el plásmido pCAGGS (Niwa *et al.* (1991) *Gene* 108:193-9). Se microinyectaron embriones de ratón BALB/c con el fragmento de restricción *SalI-PstI* de ~6 kbp, y se implantaron en ratones hembra BALB/c pseudopreñadas. La expresión de fH humano en sueros de cachorros se detectó mediante transferencia Western.

Concentraciones de fH humano en suero. Para distinguir el fH humano y del fH de ratón, se usó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) de captura de fHbp que se une específicamente a fH humano. Se añadió fHbp recombinante (2 µg/ml) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril a los pocillos de las placas de microtitulación. Después de bloquear con albúmina de suero bovino al 1 % (BSA), se añadieron diluciones de suero preinmune de ratón o humano. Se detectó fH humano unida usando antisuero anti-fH humano de oveja (Lifespan Biosciences, Seattle, WA; dilución 1: 2000). El ELISA se desarrolló con IgG anti-oveja conjugada a fosfatasa alcalina. Se añadió sustrato de fosfatasa fosfato de p-nitrofenilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y, después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se midió la densidad óptica a 405 nm. Se determinaron las concentraciones de fH en comparación con las diluciones de un suero de referencia humano que contiene 471 µg/ml de fH. Como control, se midió el fH en 25 sueros de sujetos adultos de la zona de la Bahía de San Francisco que participaron en un protocolo aprobado por el IRB para seleccionar sueros normales como fuentes de complemento para ensayos bactericidas en suero.

Vacunas de fHbp recombinante. Se purificaron proteínas mutantes R41S y fHbp recombinantes de tipo silvestre como se describe (Beernink P. T. *et al.* 2008) *Infect Immun* 76: 2568-2575). Se evaluó la inmunogenicidad de la vacuna en ratones BALB/c de tipo silvestre o transgénicos para el fH humano de seis a ocho semanas de vida, usando un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Massachusetts. Se administraron tres dosis de vacuna que contenían 20 µg de fHbp adsorbida con 600 µg de hidróxido de aluminio por vía intraperitoneal a intervalos de tres semanas. La vacuna de conjugado meningocócico del grupo C de control (Meningitec; Wyeth, Montreal, Canadá) contenía 2 µg de polisacárido y 3 µg de CRM197 adsorbido con 100 µg de fosfato de aluminio.

Análisis estadístico. Se usaron pruebas t de Student de dos colas para comparar la media geométrica de los títulos recíprocos (GMT) de las respuestas de anticuerpos en suero entre dos grupos independientes de ratones. También se usó una prueba t de una cola para examinar si las respuestas de los anticuerpos anti-fHbp de ratones transgénicos inmunizados con la vacuna de fHbp de tipo silvestre no eran inferiores a los ratones inmunizados de tipo silvestre. Se usaron modelos de regresión lineal generales para ensayar si el tipo de vacuna de fHbp y las concentraciones de fH humano afectaban a las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero. Para cumplir con la suposición de normalidad, se transformaron tanto las mediciones de los anticuerpos bactericidas en suero como las concentraciones de fH en logaritmo en base 10 en análisis de regresión y correlación. Se consideró estadísticamente significativo un valor de *p* de dos colas de menos de o igual a 0,05.

EJEMPLO 1: LA UNIÓN DEL FH HUMANO REDUCE LA INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA DE FHBP

La unión a fH a fHbp puede cubrir epítomos y alterar las respuestas de los anticuerpos dirigidas a partes de la molécula de fHbp expuestas en la superficie de las bacterias, que son las más eficaces para la actividad bactericida. Como la unión a fH humano a fHbp es específica del fH humano, se investigó el efecto de fH en la inmunogenicidad de la vacuna usando un modelo animal transgénico de fH humano. Se midieron las concentraciones de fH humano en suero a de los ratones transgénicos usando un ELISA de captura de fHbp descrito anteriormente que es específico del fH humano. Los pocillos de control contenían un fH humano purificado a concentraciones que varían de 0,15 a 5 µg/ml (**Figura 1, panel A**). Los pocillos experimentales contenían diferentes diluciones de sueros de ratones transgénicos (diluciones en serie de factor de dilución de 2 comenzando a 1:100). Las concentraciones de fH humano en el suero de los ratones transgénicos fueron > 100 µg/ml. Los compañeros de camada negativos en factor H en suero tenían concentraciones < 12 µg/ml, que era el límite inferior del ensayo). Los ratones conocidos de tipo silvestre también tenían fH humano <12 µg/ml). A efectos comparativos, las concentraciones de fH en muestras de suero almacenadas de donantes de complemento adultos > 100 µg/ml) (**Figura 1, panel B**). En los experimentos descritos a continuación, los compañeros de camada de ratones transgénicos con < 12 µg/ml o ratones de tipo silvestre conocidos se denominarán ratones "de tipo silvestre".

En el Estudio 1, se inmunizaron ratones transgénicos para fH humano o de tipo silvestre con una vacuna de fHbp recombinante que se unía al fH humano (**Tabla 1** a continuación). Tres semanas después de la tercera inyección de la vacuna, las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero de los ratones transgénicos eran 8 veces inferiores a las de los ratones silvestres cuyo fH en suero no se unió a la vacuna (GMT recíproco de 59 frente a 453 en ratones de tipo silvestre, *p* = 0,03). El Estudio 1 no incluyó una vacuna de control que no se uniera a fH. Por lo tanto, debe determinarse si la menor inmunogenicidad de la vacuna de fHbp en los ratones transgénicos se debía a la unión del antígeno vacunal con fH humano, o si los ratones podrían haber tenido respuestas de anticuerpos séricos inferiores a los antígenos vacunales en general. En el Estudio 2, se repitió la vacunación con fHbp e incluyó grupos de ratones transgénicos y de tipo silvestre inmunizados con una vacuna de conjugado de control de polisacárido meningocócico del grupo C-CRM197 que no se unía al fH humano. Las respectivas respuestas de los anticuerpos IgG y bactericidas

en suero de los ratones transgénicos inmunizados con la vacuna de conjugado meningocócico no fueron significativamente diferentes de las de los ratones de tipo silvestre (**Figura 2**). Como se observó en el Estudio 1, los ratones transgénicos inmunizados en el Estudio 2 con la vacuna fHbp que se unió a fH humano tenían menores respuestas de anticuerpos bactericidas en suero (GMT recíproca de 31 frente a 115 en ratones silvestres, $p = 0,05$, prueba t de una cola). Además, había una correlación inversa entre las concentraciones de fH humano en los sueros de los ratones transgénicos y las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero hacia la vacuna de fHbp unida a fH humano (**Figura 3, panel A**, coeficiente de correlación de Pearson, $r = -0,65$; $p = 0,02$). Por lo tanto, cuanto mayor sea la concentración de fH humano en suero, menor será la respuesta bactericida en suero a la vacuna.

En ambos estudios, las respuestas de los anticuerpos IgG anti-fHbp en suero de los ratones transgénicos fueron inferiores a las de los ratones de tipo silvestre (estudio 1, GMT recíproca de 30.000 frente a 97.000, $p = 0,03$; estudio 2, GMT recíproca de 107.000 frente a 190.000 ($p = 0,025$). En conjunto, los datos indicaron que la unión a fH humano a la vacuna de fHbp alteró tanto los títulos de anticuerpos IgG anti-fHbp como las respuestas de los anticuerpos bactericidas.

Tabla 1. Respuestas de anticuerpos bactericidas en suero mediadas por complemento de ratones de tipo silvestre o transgénicos para fH humano inmunizados con una vacuna de fHbp recombinante que se unió al fH humano

Estudio	Ratones	n.º de ratones	Vacuna de fHbp	1/Título bactericida	
				Media de Log ₁₀ ± ET	Media geométrica
1	WT	7	WT	2,66 ± 0,21 ^a	453
1	fH Tg	10	WT	1,77 ± 0,27 ^b	59
2	WT	14	WT	2,06 ± 0,20 ^c	115
2	fH Tg	14	WT	1,49 ± 0,27 ^d	31

La vacuna de fHbp WT se unió a fH. ^{a,b} $p = 0,03$ (dos colas); ^{c,d} $p = 0,05$ (hipótesis de una cola basada en los resultados del estudio 1).

EJEMPLO 2: LOS MUTANTES DE FHBP EN LAS POSICIONES 218 Y/O 239 PRODUJERON UNA REDUCCIÓN DE LA UNIÓN A FH

Se encontró que una fHbp mutante con dos sustituciones de alanina en los restos de glutamato 219 y 239 (E218 y E239) eliminó la unión a fH (Schneider M. C. *et al.* (2009) *Nature* 458:890-3). Las fHbp mutantes recombinantes E218A, E239A y E218A/E239A se prepararon por purificación mediante cromatografía de afinidad Ni²⁺ como se describe (Beernink *et al.*, (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074-8). La unión a fH humano a las fHbp mutantes se realizó mediante ELISA usando fHbp mutante recombinante o WT purificada como el antígeno en la placa como se ha descrito anteriormente. Usando este método, se confirmó que el doble mutante tuvo una reducción de la unión a fH (**Figura 4**). Además, las fHbp mutantes con mutaciones individuales en E218 o E239 también tuvieron una reducción de la unión a fH humano (**Figura 4**).

EJEMPLO 3: LAS FHBP MUTANTES E218A Y/O E239A HAN AFECTADO A LA INMUNOGENICIDAD EN RATONES DE TIPO SILVESTRE.

Se sometieron la fHbp ID1 de tipo silvestre y la fHbp doble mutante E218A/E239A respectivas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se purificaron fHbp recombinantes expresadas en *Escherichia coli* mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺, y se cargaron cinco µg de proteína purificada en el gel. Se procesó un gel de gradiente de poliacrilamida NuPAGE al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 200 V durante 45 min en tampón MES (Invitrogen) y se tiñó con tinte Simply Blue Safe (Invitrogen). Los patrones de masa molecular fueron Kaleidoscope Broad Range (Bio-Rad, Richmond, CA). Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie, y resultaron tener masas y pureza similares (**Figura 5**).

Se realizó el ELISA de inhibición (Beernink *et al.*, (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074-8) tanto para fHbp ID1 de tipo silvestre como para la doble mutante E218A/E239A. Se recubrió la placa de ELISA con fHbp recombinante (ID 1) a 2 µg/ml durante la noche a 4 °C. Tras el bloqueo con PBS/BSA al 1 %, se premezclaron anticuerpos monoclonales anti-fHbp murinos (JAR 1 o JAR 4 a 0,5 µg/ml; mAb502 o JAR 5 a 0,1 µg/ml) y diluciones en serie de factor de dilución de cinco de inhibidor de proteína recombinante soluble a partir de 50 µg/ml (concentraciones finales) y se añadieron a los pocillos de la placa y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se detectó la unión de los Acm con IgG de cabra anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina (1:10.000, Sigma-Aldrich) durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se desarrolló como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Los resultados muestran que los epítomos reconocidos por cuatro anticuerpos monoclonal anti-fHbp se conservaron en la doble mutante E218A/E239A en comparación con la fHbp de tipo silvestre según la capacidad de la proteína mutante o de tipo silvestre soluble para inhibir la unión de cada uno de los Acm a fHbp de tipo silvestre, que se adsorbió a los pocillos de la placa de microtitulación (**Figura 6**).

También se determinó la estabilidad térmica de las fHbp. Se sometieron las proteínas recombinantes purificadas a diálisis frente a PBS (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) durante la noche a 4 °C. La concentración se midió por absorbancia UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de 0,8940 M⁻¹cm⁻¹, y se ajustó a una concentración de 0,5 mg/ml. Se cargaron solución de proteína desgasificada y PBS en la muestra y las células de referencia, respectivamente, de un microcalorímetro VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA). La velocidad de calentamiento fue de 60 °C/h, y se usó la configuración de ganancia media. Los datos se corrigieron en la línea basal usando una exploración de tampón frente a tampón, y se normalizaron basándose en la concentración de proteína. La doble mutante E218A/E239A resultó tener una estabilidad térmica similar a la de la proteína de tipo silvestre (**Figura 7A**), al igual que una mutante R41S (**Figura 7B**).

Se midió la inmunogenicidad de las vacunas de fHbp ID 1 de tipo silvestre (WT) y mutante E218A/E239A en cuatro estudios en ratones (Estudios 3-6). En el Estudio 3, se inmunizaron ratones CD-1 con tres dosis de fHbp WT recombinante o fHbp mutante adsorbida con adyuvante de Freund (FA) o hidróxido de aluminio (Al(OH)₃); en el Estudio 4, se inmunizaron ratones CD-1 con una dosis de fHbp de tipo silvestre (WT) o fHbp mutante adsorbida con hidróxido de aluminio (Al(OH)₃); en los estudios 5 y 6, se inmunizaron ratones BALB/c con tres dosis de fHbp WT o fHbp mutante adsorbida con hidróxido de aluminio (Al(OH)₃). En el Estudio 3, se combinaron los sueros (3 combinaciones por grupo de vacuna, cada combinación de sueros de 3 a 4 ratones). En los Estudios 4, 5 y 6, se analizaron sueros individuales (N = 7 a 9 ratones por grupo de vacuna).

Para medir los títulos de IgG anti-fHbp en suero, se sensibilizaron las placas de ELISA con fHbp ID1 recombinante a 2 µg/ml durante la noche a 4 °C. Tras bloquear con PBS/BSA al 1 %, se añadieron diluciones de antisuero de ratón (factor de dilución de cinco en serie a partir de 1:100) a los pocillos de la placa, y se incubó la placa durante 1 h a 37 °C. Se detectaron los anticuerpos anti-fHbp unidos con IgG de cabra anti-ratón (1:10.000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se reveló usando sustrato de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se midió la densidad óptica a 405 nm.

Como se muestra en la Figura 7C y D, en los cuatro estudios (Estudios 3, 4 y 5, **Figura 7C** y Estudio 6, **Figura 7D**), el doble mutante E218A/E239A tuvo respuestas de anticuerpos IgG anti-fHbp en suero reducidas en ratones BALB/c o CD-1 convencionales en comparación con la vacuna de fHbp de tipo silvestre de control. Las diferencias respectivas fueron significativas ($p < 0,05$) para los estudios 4, 5 y 6 cuando se analizaron sueros individuales en lugar de los sueros combinados usados en el estudio 3. El Estudio 6 (**Figura 7D**) también incluyó una vacuna de fHbp mutante con una sola sustitución de aminoácido, E239A, que mostró títulos de IgG inferiores a la vacuna de fHbp WT ($p = 0,05$).

La siguiente **Tabla 2** resume las respuestas del anticuerpo bactericida en suero a la vacuna de mutante E218A/E239A medidas contra la cepa H44/76 del grupo B. En todos los estudios, la vacuna de mutante generó títulos bactericidas inferiores en suero. Las diferencias respectivas fueron significativas en los estudios 4, 5 y 6 ($p < 0,05$).

En estos estudios, ni el doble mutante ni la fHbp de tipo silvestre se unieron al fH de ratón. Sin embargo, la menor inmunogenicidad del mutante E218A/E239A indicó que los epítomos importantes para generar anticuerpos protectores bactericidas se perturbaron por la introducción de las dos mutaciones. Como tales, las mutaciones E218A/E239A que eliminaron la unión a fH no mantuvieron necesariamente las características de la vacuna estructural óptima para generar anticuerpos protectores.

Tabla 2. Respuestas de anticuerpos bactericidas en suero mediadas por complemento de ratones de tipo silvestre inmunizados con la vacuna de fHbp mutante E218A/E239A

Estudio ^a	Cepa de ratón	N.º de dosis	Vacuna de fHbp			
			WT		Mutante E218A/E239A	
			1/Media de Log ₁₀ ± 2ET	1/GMT	1/Media de Log ₁₀ ± 2ET	1/GMT
3	CD-1	3	2,63 ± 0,54	427	2,31 ± 0,25	206
4	CD-1	1	1,26 ± 0,36 ^c	18	0,80 ± 0,14 ^c	6
5	BALB/c	3	3,30 ± 0,30 ^d	1.986	1,68 ± 0,60 ^d	48
6	BALB/c	3	1,89 ± 0,22 ^e	77	0,95 ± 0,26 ^e	9

La actividad bactericida se midió con complemento humano contra la cepa H44/76; en los Estudios 3, 5 y 6, los ratones fueron inmunizados con tres dosis de vacuna. En el Estudio 4, se administró una dosis.

^c $p < 0,05$

^d $p < 0,05$

^e $p = 0,01$

EJEMPLO 4: IDENTIFICACIÓN DE UNA VARIANTE DE FHBP NATURAL CON UNIÓN A FH REDUCIDA

En estudios de unión a fH por variantes de fHbp naturales dentro de la subfamilia B descrita anteriormente (Fletcher *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100), también denominado grupo de variante 1 (Masignani *et al.* (2003) *supra*), las proteínas recombinantes de dos variantes de fHbp, ID 14 y 15, mostraron significativamente menos unión a fH dependiente de la concentración que la de la proteína fHbp ID 1 (**Figura 8**). Por el contrario, la fHbp ID 14 mostró la unión esperada dependiente de la concentración con anticuerpos monoclonales anti-fHbp JAR 4 y JAR 5, y fHbp ID 15 mostró la unión esperada con anticuerpos monoclonales anti-fHbp JAR 5, pero no con JAR 4 (Nota, no era de esperar que fHbp ID 15 se uniera con JAR 4, porque esta proteína carece del epítipo) (Beernink *et al.* (2009) *Mol Immunol* 46:1647-1653; Pajon *et al.* (2009) *Vaccine* 28:2122-2129)).

Los datos previos indicaron que la fHbp representativa de los grupos de variantes 1, 2 o 3 mostró una unión respectiva similar con fH (Shaughnessy J. *et al.* (2009) *Infect Immun* 77:2094-103). Como tal, no era de esperar la unión reducida de fH por dos variantes de fHbp naturales (fHbp ID 14 y 15 como se muestra en la **Figura 8**).

Los datos obtenidos según lo representado en la **Figura 8** que muestran baja unión a fH por dos variantes de fHbp naturales indican que los restos amino que contribuyen a dicha unión a fH inferior se pueden identificar mediante análisis de alineaciones de las secuencias de aminoácidos de fHbp de altos y bajos aglutinantes de fH. Esta estrategia sería diferente de una dirigida a restos conservados, tales como los restos E218A y E239A.

Las variantes de fHbp se pueden subclasificar de acuerdo con diferentes combinaciones de cinco segmentos variables, cada uno derivado de uno de dos linajes genéticos, denominados tipos α o β (Pajon *et al.* (2009) *Vaccine* 28:2122; Beernink y Granoff (2009) *Microbiology* 155:2873-83). fHbp ID 1 con alta unión a fH e ID 14 con baja unión a fH están ambos en el grupo modular I (los cinco segmentos son tipos α). Por el contrario, el segundo aglutinante bajo de fH, fHbp ID 15, está en el grupo modular IV, que son quimeras naturales (con un segmento A de tipo β y segmentos B, C, D y E de tipo α). Por lo tanto, como control para el segmento A de tipo β del péptido ID 15, se usó la secuencia del péptido variante ID 28 de unión a fH alta de forma natural, que contiene solo segmentos β (grupo modular II). Las respectivas alineaciones de aminoácidos se muestran en las **Figuras 19A y 19D**. Con fines de comparación de las secuencias de las diferentes variantes, los restos específicos se denominan en el presente documento basándose en la numeración de fHbp ID1. Uno de estos restos de aminoácidos, serina (S), en la posición 41 del segmento A (β) del péptido 15 (baja unión a fH) difería del resto de prolina (P) del segmento A β de control del péptido 28 (alta unión a fH). Un segundo aminoácido, E en la posición 241 en los segmentos E α de ambas variantes de unión a fH baja, difería del de K en la posición 241 del péptido variante 1 de alta unión a fH.

EJEMPLO 5: IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS FHBP MUTANTES EN LA POSICIÓN 41 CON UNIÓN A FH REDUCIDA

El resto de arginina de la posición 41 (R41) formó un enlace de hidrógeno cargado con fH (**Figura 9, panel A**). La arginina fue reemplazada por serina para eliminar este enlace cargado (S41, panel de inserción inferior derecho). Los pocillos de las placas de microtitulación se recubrieron con fHbp ID 1 WT recombinante o R41S mutante ID 1. Mediante ELISA, el mutante R41S no se unió a fH humano (**Figura 10, panel A**). Los Acm anti-fHbp de control, JAR 4 y JAR 5, se unieron de forma casi idéntica tanto a las fHbp mutantes como a las fHbp de tipo silvestre (**Figura 10, paneles B y C**). Estos controles indicaron que se adsorbieron cantidades comparables de las respectivas proteínas en los pocillos de la placa de microtitulación. Además, la mutación R41S, que estaba en el mismo dominio y muy cerca del epítipo conformacional de fHbp reconocido por el Acm JAR 4 (Beernink P. T. (2009) *Mol Immunol* 46:1647-53), no afectó a la unión del Acm. Una mutación adicional en fHbp ID 1 en la que la alanina se sustituyó con arginina, R41A, tampoco se unió a fH (**Figura 10A**). Por lo tanto, las sustituciones distintas de la serina en la posición 41 también pueden disminuir la unión a fH.

En experimentos de resonancia de plasmón de superficie, se inmovilizó fH humano (2.400 unidades de respuesta) en un chip CM5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) mediante acoplamiento de aminas, y se midió la unión de fHbp soluble. La proteína mutante R41S (0,5 μ M) no mostró unión con fH (-0,6 unidades de respuesta) en comparación con +22,5 unidades de respuesta con 0,5 μ M del respectivo antígeno fHbp de tipo silvestre, lo que confirmó de forma independiente los resultados de ELISA. La proteína mutante R41S también tuvo estabilidad térmica en comparación con la de la fHbp de tipo silvestre (**Figura 7, panel B**).

La mutación R41S también eliminó la unión a fH cuando la mutación se introdujo en otras variantes de secuencia de fHbp del grupo de variante 1, grupo modular I. Estas incluyeron fHbp ID 4, 9 y 74 (**Figura 11, paneles A, C y E**,

respectivamente). Sin embargo, la mutación R41S en tres variantes de secuencia del grupo de variante 2 (grupos modulares III o VI) no disminuyó la unión a fH. Estas incluyen fHbp ID 19, 22 y 77 (**Figura 12, paneles A, C y E, respectivamente**).

5 EJEMPLO 6: INMUNOGENICIDAD DE FHBP MUTANTE R41S EN RATONES DE TIPO SILVESTRE

En ratones de tipo silvestre, la vacuna de fHbp (ID 1) mutante R41S generó respuestas de anticuerpos bactericidas en suero similares a las de la vacuna de tipo silvestre (**Tabla 3, a continuación, Estudios 2 y 6**). En el estudio 6, una vacuna de doble mutante fHbp, E218A/E239A, sobre la que previamente se había informado que no se unía a fH (Schneider M. C. *et al.* (2009) *Nature* 458:890-3), pero tenía inmunogenicidad alterada en ratones WT (Beernink *et al.* (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074), sirvió como control negativo. Esta vacuna generó títulos bactericidas significativamente inferiores (**Tabla 3, Estudio 6**) y confirmó así los datos descritos en la **Tabla 2** anterior, que muestran respuestas de anticuerpos disminuidas hacia la vacuna E218A/E239A por la posible pérdida de epítomos o desestabilización leve de la molécula mutante (Beernink *et al.* (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074-8). Por el contrario, las respuestas de anticuerpos normales a la vacuna de fHbp mutante R41S indicaron que la sustitución de serina con arginina no disminuyó la inmunogenicidad en un modelo de ratón en el que fH no se unió a las vacunas de fHbp mutantes o de tipo silvestre.

Tabla 3. Respuestas de anticuerpos bactericidas en suero mediadas por complemento de ratones de tipo silvestre inmunizados con vacunas de fHbp recombinante

Estudio	Ratones	n.º de ratones	Vacuna de fHbp	1/Título bactericida	
				Media de Log ₁₀ ± ET	Media geométrica
2	WT	14	WT	2,06 ± 0,20	115 ^a
2	WT	13	R41S	1,92 ± 0,20	83 ^b
6	WT	9	WT	1,89 ± 0,22	77 ^c
6	WT	9	E218A/E239A	0,95 ± 0,26	9 ^d
6	WT	9	R41S	1,85 ± 0,31	71 ⁱ

La vacuna de fHbp WT se unió a fH humano; el mutante R41S y el mutante E218A/E239 previamente descritos (Schneider *et al.* (2009) *Nature* 458:890-3) no se unió a fH humano. En ratones WT, el fH nativo no se une a ninguna vacuna (Figura 1, Panel D). ^{a,b}*p* = 0,62; ^{c,d}*p* = 0,01; ^{d,i}*p* = 0,92, mediante pruebas *t* (dos colas).

25 EJEMPLO 7: RESPUESTAS DE ANTICUERPOS BACTERICIDAS EN SUERO DE RATONES TRANSGÉNICOS INMUNIZADOS CON LA VACUNA DE FHBP MUTANTE R41S

Los ratones transgénicos para fH humano inmunizados con la vacuna de mutante R41S que no se unieron a fH humano tenían respuestas de anticuerpos bactericidas en suero ~3 veces superiores a las de los ratones transgénicos para fH humano inmunizados con la vacuna de control de fHbp de tipo silvestre que se unió a fH (Estudio 2, **Tabla 4** a continuación). Cuando los datos se estratificaron por concentraciones de fH humano en suero, los ratones con concentraciones de fH < 250 µg/ml mostraron respuestas similares a las vacunas de mutantes y de tipo silvestre. Sin embargo, entre los ratones con concentraciones de fH humano > 250 µg/ml, los inmunizados con la vacuna de mutante R41S tenían respuestas de anticuerpos bactericidas 10 veces superiores a las de los inmunizados con la vacuna de fHbp de tipo silvestre que se unió a fH humano (*p* < 0,05; **Tabla 4**).

Tabla 4. Respuestas de anticuerpos bactericidas en suero de ratones transgénicos para fH humano inmunizados con la vacuna de mutante R41S

Estudio	fH humano, µg/ml	n.º de ratones	Vacuna de fHbp	1/Título bactericida	
				Media de Log ₁₀ ± ET	Media geométrica
2	> 100	14	WT	1,49 ± 0,27 ^a	31
2	> 100	13	R41S	1,98 ± 0,23 ^b	96
Análisis estratificado por concentración de fH humano					
2	< 250	7	WT	2,02 ± 1,16 ^c	105
2	< 250	8	R41S	2,11 ± 0,78 ^d	129
2	≥ 250	6	WT	0,80 ± 0,10 ^e	6
2	≥ 250	5	R41S	1,78 ± 0,44 ^f	60

La vacuna de fHbp WT se unió a fH humano; la mutante R41S no se unió a fH humano. Los datos para los ratones transgénicos para fH inmunizados con la vacuna de tipo silvestre se muestran en el Estudio 2, **Tabla 1** anterior.

^{a,b}Usando modelos de regresión lineal general, el efecto del tipo de vacuna de fHbp R41S mutante o de tipo silvestre difirió en la concentración en suero de fH humano sobre el título bactericida, $p = 0,018$; ^{c,d} $p > 0,5$; ^{e,f} $p = 0,05$.

En ratones transgénicos para fH humano inmunizados, no hubo una correlación significativa entre las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero a la vacuna de fHbp mutante que no se unió a fH humano y las concentraciones de fH humano en suero (**Figura 3, panel B**; $r = +0,17$; $p = 0,58$), mientras que, como se ha descrito anteriormente (**Figura 3, panel A**), en los ratones transgénicos, hubo una correlación inversa con los títulos bactericidas generados por la vacuna de tipo silvestre que se unió a fH ($r = -0,65$; $p = 0,02$). Los respectivos coeficientes de correlación para las dos vacunas fueron significativamente diferentes entre sí ($p = 0,03$).

Se usaron modelos de regresión lineal general para confirmar si el tipo de vacuna de fHbp (fHbp de tipo silvestre o mutante R41S) o la concentración en suero de fH humano afectaba a las respuestas de anticuerpos bactericidas en suero de los ratones transgénicos. Hubo una interacción significativa entre el tipo de vacuna de fHbp y la concentración de fH humano en la respuesta bactericida (ensayo de razón de verosimilitud, $p = 0,018$). Basándose en el modelo de regresión, se estimaron las proporciones de GMT bactericidas en suero recíprocas para los ratones transgénicos inmunizados con la vacuna de mutante R41S frente a los de los ratones transgénicos inmunizados con la vacuna de fHbp que unió a fH humano a diversas concentraciones de fH humano en suero (**Figura 3, panel C**). Si bien no hubo diferencias significativas en las respuestas bactericidas cuando las concentraciones de fH humano en suero fueron bajas ($<250 \mu\text{g/ml}$), las respuestas bactericidas a la vacuna de mutante R41S fueron significativamente mayores cuando las concentraciones de fH en suero eran superiores ($\text{fH} > 250 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$; $\text{fH} > 316 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,01$). Dado que muchos seres humanos tienen concentraciones de fH en este intervalo (**Figura 1, panel B**), los resultados en los ratones transgénicos sugieren que las moléculas de fHbp mutante que no se unen a fH pueden ser vacunas superiores en seres humanos.

Los protocolos experimentales de diversos estudios de inmunización presentados anteriormente, así como los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 5. Sumario de estudios de inmunización en ratones transgénicos para fH humano

Estudio	Cepa de ratones BALB/c	Vacuna/s meningocócicas	Unión de fH a la vacuna	Resultados
1	fH humano Tg	Proteína de unión al Factor H (fHbp)	Sí ¹	Respuesta de IgG y anticuerpos bactericidas en suero inferior de los ratones Tg cuyo fH humano se unió al antígeno vacunal
	Control de tipo silvestre	fHbp	No ²	
2A	fH humano Tg	fHbp	Sí ¹	Respuestas de IgG y anticuerpos bactericidas en suero inferiores confirmadas de los ratones Tg
	Control de tipo silvestre	fHbp	No ²	
2B	fH humano Tg	Conjugado de PS-CRM del Grupo C	No ³	Los ratones de tipo silvestre y Tg mostraron respuestas de IgG y bactericidas en suero respectivas casi idénticas hacia una vacuna meningocócica de control que no se unió a fH
	Control de tipo silvestre	Conjugado de PS-CRM del Grupo C	No ⁴	

2C	fH humano Tg	fHbp	Si ¹	- Respuestas de anticuerpos bactericidas en suero superiores a la fHbp mutante que no se unió a fH, en especial, para los ratones con niveles altos de fH humano en suero. - Para la vacuna que se unió a fH humano, correlación inversa entre el título bactericida en suero y la concentración de fH humano en suero. - Para la vacuna de mutante que no se unió a fH humano, no hubo correlación significativa entre los títulos bactericidas en suero y las concentraciones de fH humano en suero. Por consiguiente, en ratones vacunados con fHbp mutante, los títulos bactericidas en suero fueron independientes de la concentración de fH humano en suero.
	fH humano Tg	fHbp mutante R41S	No ⁵	

La **Figura 2, panel D** proporciona una ilustración esquemática de cada protocolo experimental correspondiente a los diversos estudios presentados en el presente documento. El número sobre cada ilustración de la **Figura 2D** corresponde a los superíndices en la tabla anterior. Los conjugados de PS-CRM del grupo C son un conjugado de polisacárido (PS) meningocócico del grupo C y un toxoide diftérico de mutante reactivo (CRM), y se denominan MenC-CRM en la **Figura 2, panel D**.

EJEMPLO 8: EL REPERTORIO DE ANTICUERPOS DE RATONES TRANSGÉNICOS INMUNIZADOS CON LA VACUNA DE FHBP MUTANTE R41S SE UNE PREFERENTEMENTE A EPÍTOPOS CERCANOS AL SITIO DE UNIÓN DE FH

Se ensayó la importancia de la unión del fH humano que cubre los epítomos de fHbp para generar anticuerpos con actividad funcional protectora. Se midió la capacidad de fH humano endógeno presente en diluciones 1:100 de sueros de ratones transgénicos para unirse a fHbp mediante ELISA. Como era de esperar, en ausencia de anticuerpos anti-fHbp en suero, hubo una unión similar de fH humano en sueros de preinmunización de los dos grupos de vacuna y los ratones transgénicos de control (Tg) solo con hidróxido de aluminio (**Figura 13, panel A**). No hubo unión en los ratones WT de control que recibieron hidróxido de aluminio, ya que el fH nativo no se unió a fHbp. Después de la vacunación, se detectó menos fH humano "libre" en los sueros de ratones inmunizados con la fHbp mutante R41S que en los sueros de ratones inmunizados con la vacuna que se unía al fH humano ($p = 0,001$, **Figura 13, panel B**) o en sueros de ratones transgénicos que solo habían recibido hidróxido de aluminio (**Figura 13, panel B**). Dado que los respectivos títulos de anticuerpos IgG anti-fHbp fueron similares en los dos grupos de vacuna de fHbp (**Figura 13, panel D**), las concentraciones de fH humano detectables inferiores en los sueros tras la inmunización con R41S coincidieron con una mayor capacidad de los anticuerpos anti-fHbp para inhibir la unión de fH humano a fHbp que los anticuerpos anti-fHbp generados por la vacuna de tipo silvestre que se unió a fH humano. Los sueros individuales de ratón ($N = 11$ por grupo) también se analizaron a diferentes diluciones en presencia de suero humano normal al 5 % como fuente de fH. A diluciones 1:100 y 1:400, la inhibición fue significativamente mayor en el grupo de vacuna de mutante R41S ($p < 0,03$), **Figura 13, panel C**). En conjunto, la mayor inhibición de fH en el grupo de vacuna de mutante R41S sugirió que había diferencias en el repertorio de anticuerpos generados por las dos vacunas. Por ejemplo, los anticuerpos generados por la vacuna de fHbp mutante pueden haberse dirigido más a epítomos cerca del sitio de unión a fH, que serían más eficaces para bloquear la unión de fH que el repertorio de anticuerpos generado por la vacuna que se unió a fH. Además, cabría esperar que los anticuerpos dirigidos a las regiones expuestas a la superficie de fHbp que también se unen a fH tuvieran una mayor actividad bactericida funcional.

También se observó una correlación significativa (valor de r Spearman, 0,69 y valor de p de 0,0004) entre la capacidad del suero de ratón individual para inhibir la unión de fH humano a fHbp y el título bactericida sérico recíproco (**Figura 13, panel E**). En la reacción bactericida en suero, una disminución en la unión del inhibidor del complemento fH a la superficie bacteriana del organismo de ensayo puede haber contribuido a los títulos bactericidas más altos generados por la vacuna de fHbp mutante. Por lo tanto, la capacidad de los anticuerpos anti-fHbp para inhibir la unión de fH predijo la actividad de anticuerpos protectores, que fue mayor para la vacuna de R41S.

EJEMPLO 9: IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES ADICIONALES EN FHBP ID 1 CON UNIÓN A FH REDUCIDA

La posición 241 está en la superficie de contacto de unión a fH de fHbp ID 1. Se investigó el efecto de las sustituciones de aminoácidos sobre la unión a fH en el resto 241 en la secuencia de fHbp ID1. Como se muestra en la **Figura 14, panel A**, el reemplazo del resto lisina (K) 241 con glutamato (E) (K241E) en fHbp ID 1 no tuvo efecto sobre la unión a fH. La sustitución inversa, el mutante E241K de fHbp ID 15 del grupo modular IV (**Figura 14, panel C**) tampoco mostró un efecto significativo sobre la unión de fH con relación a la fHbp de tipo silvestre (<2 veces, **Figura 14, panel C**). (La numeración de los restos de aminoácidos se basa en la secuencia de fHbp ID 1).

En fHbp ID 1, las mutaciones en las posiciones R41, H119, R130 y K241. Las fHbp mutantes se produjeron como se ha descrito anteriormente. A continuación, se evaluaron los mutantes de sustitución simple R41A, H119A, R130A y K241E para la unión a fH humano y para la unión a los anticuerpos monoclonales.

5 Como se muestra en la **Figura 10, panel A**, la sustitución de R41S y la sustitución de R41A en fHbp ID 1 redujeron la unión a fH humano. Como se muestra en la **Figura 10, panel B y C**, los mutantes R41S y R41A retuvieron la unión a los anticuerpos monoclonales JAR 4 y JAR 5, respectivamente, lo que indicó que estos epítomos se conservan en los mutantes R41S y R41A.

10 Como se muestra en la **Figura 15, panel A**, las sustituciones H119A y R130A en fHbp ID 1 redujeron la unión a fH humano. Como se muestra en la **Figura 15**, los mutantes H119A y R130A retuvieron la unión al anticuerpo monoclonal JAR5 (panel B) y redujeron la unión al anticuerpo monoclonal JAR4, en comparación con la correspondiente fHbp ID 1 de tipo silvestre (panel C). Estos datos indican que el epítipo JAR5 se conserva en los mutantes H119A y R130A; y que el epítipo JAR 4 se conserva parcialmente mediante las sustituciones de aminoácidos.

EJEMPLO 10: MUTANTES EN VARIANTES DE SECUENCIA DE FHBP DEL GRUPO MODULAR IV DE FHBP

20 Los segmentos "V_A" del grupo de variante 1, las variantes de secuencia de fHbp clasificadas como variante 1, grupo modular IV (**Figura 16**) derivan de un linaje genético diferente (β) al de los segmentos "V_A" correspondientes de la variante 1, variantes de secuencia de fHbp del grupo modular I, que se designan como segmentos α (Beernink *et al* (2009) *Microbiology* 155:2873). Los linajes α y β respectivos también se pueden designar como linajes 1 y 2, de acuerdo con la nomenclatura adoptada por el sitio Web pubmlst.org/neisseria/fHbp/.

25 En las variantes de secuencia de aminoácidos de fHbp del grupo modular IV, a menudo hay una serina en la posición 41 en lugar de arginina. La sustitución de prolina con serina (S41P) en una mutante de fHbp ID 15 (grupo modular IV) eliminó la unión de fH (**Figura 17**). Las proteínas de control incluían las fHbp ID recombinantes 1 y 28 (aglutinantes de fH naturalmente altos) y fHbp ID 15 (aglutinante de fH naturalmente bajo). La unión del factor humano H o los Acm anti-fHbp a fHbp se midió mediante ELISA como se ha descrito anteriormente. El Acm anti-fHbp JAR 5 mostró una unión similar con las fHbp WT ID 1 y 15 y la mutante S41P de fHbp ID 15 (**Figura 17, panel B**). JAR 31 mostró la unión esperada de fHbp ID 28 (**Figura 17, panel C**).

EJEMPLO 11: LAS SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS DE R41S EN VARIANTES DE SECUENCIA DE FHBP DE LOS GRUPOS MODULARES III Y VI NO AFECTAN A LA UNIÓN A FH.

35 Todas las variantes de secuencia de fHbp clasificadas como variante 2 son quimeras naturales que contienen segmentos derivados de los linajes α y β (**Figura 16**). En concreto, los segmentos "V_A" de las proteínas de variante 2 se derivan de los linajes α y como en el grupo modular I frecuentemente contienen una arginina en el resto 41 (numeración de los restos según fHbp ID 1). Aunque la sustitución de R41S en todas las proteínas del grupo modular I analizadas eliminó la unión a fH (**Figuras 11 y 10 y Tabla 6**), la mutación R41S en fHbp ID 19, 22 y 77 del grupo de variante 2 (grupos modulares III o VI) no eliminó la unión a fH (**Figura 12, paneles A, C y E y Tabla 7**).

EJEMPLO 12. PROTEÍNAS QUIMÉRICAS FHBP SINTÉTICAS QUE NO SE UNEN AL FH HUMANO

45 Se muestra una fHbp quimera I (Beernink y Granoff (2008) *Infect. Immun.* 76:2568-75) como el último esquema modular en la **Figura 16**. El punto de unión en el que parte de fHbp ID 1 (variante 1, grupo modular I) se fusiona con la parte de fHbp 77 (variante 2, grupo modular VI) es G136, que reside en el segmento V_C. En la **Figura 16**, V_C se representa como medio gris y medio blanco en la proteína quimérica para representar la fusión de una secuencia de linaje α con una secuencia de linaje β en ese segmento. Cuando se introdujo la sustitución R41S en la proteína fHbp variante 2, no hubo efecto sobre la unión a fH (**Figura 12, paneles A, C y E**). Por el contrario, cuando la sustitución de R41S se insertó en la proteína fHbp quimera I, la mutación eliminó la unión a fH. (**Figura 18**). Estos resultados no se anticiparon, ya que las únicas diferencias de aminoácidos entre los respectivos segmentos V_A de la quimera I y fHbp ID 77 fue un resto de aminoácido (Gly30 en el antígeno quimérico en lugar de Ser30; **Figura 19**). En el segmento V_C, hubo diferencias en ocho de los restos entre las posiciones 98 y 135 (**Figura 19**), lo que puede explicar por qué la mutación R41S eliminó la unión a fH en la proteína quimérica, pero no en las proteínas de variante natural 2 (que se muestran esquemáticamente en la **Figura 16**, y la secuencia completa de aminoácidos mostrada en la **Figura 19A**). Estas observaciones implican que los restos de esta parte de la región V_C son importantes para la estabilidad del complejo de fHbp-fH en las fHbp del grupo de variante 2.

EJEMPLO 13. EFECTO DE LAS SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS ADICIONALES EN FHBP ID 77 (GRUPO MODULAR VI) SOBRE LA UNIÓN A FH

65 Las mutaciones de alanina en las posiciones K113, K119, D121, se introdujeron en fHbp ID 77 (Grupo modular VI, grupo de variante antigénica 2). Como se ha indicado anteriormente, el número de posición del resto se basa en la fHbp ID 1. Las fHbp se produjeron como se ha descrito anteriormente en el apartado de Materiales y métodos.

Se ensayó la capacidad de estos mutantes para unirse al fH humano mediante ELISA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2 y se comparó con la fHbp de tipo silvestre correspondiente. La introducción de la mutación K119A aumentó la unión a fH aproximadamente 4 veces en comparación con fHbp ID 77 de tipo silvestre (**Figura 20, Panel A**); K113A no tuvo ningún efecto sobre la unión de fH (**Figura 20, Panel A**), mientras que D121A disminuyó la unión a fH aproximadamente 4 veces en comparación con la unión a fH por fHbp ID 77 de tipo silvestre (**Figura 20, Panel A**). JAR 31 anti-fHbp se unió a las tres mutantes, lo que indicaba que las respectivas sustituciones de aminoácidos no afectaban al epítipo reconocido por este Acm.

También se construyeron dobles sustituciones de aminoácidos, R41S/K113A, R41S/K119A y R41S/D121A en fHbp ID 77. La mutante R41S/K119A mostró una disminución de aproximadamente 5 veces en la unión a fH mediante ELISA (**Figura 21, Panel A**), mientras que la mutante R41S/K113A y R41S/D121A tuvo una unión de 10 veces menos a fH que la fHbp ID 77 de tipo silvestre (**Figura 21, Panel A y Tabla 6**). El Acm anti-fHbp JAR 31 mostró una unión similar con los tres de estos dobles mutantes de ID 77 y la fHbp ID 77 de tipo silvestre, que indicó que había cantidades similares de cada una de las variantes de fHbp adheridas a los pocillos de microtitulación y que estas sustituciones de aminoácidos no afectaron al epítipo reconocido por este Acm.

Se introdujo una sustitución triple de aminoácidos R41S/K113A/D121A en fHbp ID 77. Este triple mutante no mostró unión a fH (**Figura 22, Panel A**). La fHbp mutante retuvo la unión a JAR 31 (**Figura 22, Panel C**), pero eliminó la unión a JAR 4 (**Figura 22, Panel B**). Por el contrario, la doble mutante K113A/D121A tuvo una unión aproximadamente 10 veces menor a fH, lo que indicaba que estas sustituciones además de la sustitución de R41S contribuyeron a la pérdida de la unión a fH.

EJEMPLO 14. EFECTO DE LAS SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS EN FHBP ID 22 (GRUPO MODULAR III) SOBRE LA UNIÓN A FH

fHbp ID 22 es representativa de las variantes de secuencia de fHbp del grupo modular III (grupo de variante 2, **Figura 16**). Se introdujeron mutaciones en fHbp ID 22 en las posiciones R80, D211, E218, D248, G236 (**Tabla 6**), y R41, Q38, A235, Q126, D201 y E202 (**Tabla 7**). Las fHbp mutantes se produjeron como se ha descrito anteriormente. En concreto, se introdujeron las sustituciones R80A, D211A, E218A, E248A, R41S, Q38A, Q126A, G236I, A235G, D201A y E202A individualmente en fHbp ID 22. Además, se introdujeron las sustituciones dobles T220A/H222A en fHbp ID 22. A continuación, se caracterizaron las mutantes para la unión a fH y se unieron a los Acm anti-fHbp mediante ELISA (**Tablas 6 y 7**).

Se ensayó la capacidad de estas mutantes para unirse a fH humano como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2, y se comparó con la capacidad de fHbp ID 22 de tipo silvestre para unirse a fH humano. Los resultados se muestran en la **Figura 23, paneles A-C** y se resumen en las **Tablas 6 y 7**. Como se muestra en la **Figura 23 paneles A y B**, las sustituciones D211A, R80A, E218A y E248A en fHbp ID22 redujeron la unión a fH en más de 50 veces en comparación con la unión a fH por la fHbp ID 22 de tipo silvestre (véase también la **Tabla 6**). Como se muestra en la **Figura 23 panel C**, las sustituciones R41S, Q38A y Q126A no redujeron significativamente la unión a fH (< 4 veces, véase también la **Tabla 7**).

Como se muestra en la **Figura 24, paneles A y B**, las mutantes R80A, D211A, E218A y E248A de fHbp ID22 retuvieron la unión al Acm JAR31, lo que indica que el epítipo JAR31 se conserva en cada una de estos mutantes.

Como se muestra en la **Figura 25, paneles A y B**, las mutantes D211A y E218A de fHbp ID 22 retuvieron la unión al Acm JAR4, lo que indica que el epítipo JAR4 se conserva en cada una de estos mutantes. Como se muestra en la **Figura 25**, la mutante R80A no retenía la unión al Acm JAR4 (panel A), y la mutante E248A mostró una unión reducida al Acm JAR4 (panel B).

Como se muestra en la **Figura 26, paneles A y B**, las mutantes R80A, D211A, E218A y E248A de fHbp ID 22 retuvieron la unión al Acm JAR35, lo que indica que el epítipo JAR35 se conserva en cada una de estos mutantes.

Como se muestra en la **Figura 27, panel A**, la doble sustitución T220A/H222A y la sustitución sencilla G236I en fHbp ID 22 redujeron la unión a fH humano en más de 50 veces en comparación con la unión a fH por fHbp ID 22 de tipo silvestre (véase también la **Tabla 6**). Como se muestra en **Figura 27**, la mutante T221A/H223A en fHbp ID 22 conservó la unión al Acm JAR31 (panel B), Acm JAR 35 (panel C) y Acm JAR 4 (panel D), lo que indica que los epítipos JAR31, JAR35 y JAR4 se conservan en la mutante T220A/H222A. Como se muestra en la **Figura 27**, la mutante G236I en fHbp ID 22 retenía la unión al Acm JAR 35 (panel C), pero mostró una unión reducida al Acm JAR 31 (panel B) y tuvo poca o ninguna unión a JAR 4 (panel D).

Como se muestra en la **Figura 28, panel A**, las sustituciones sencillas R41S, Q38A y A235G en fHbp ID 22 no redujeron significativamente la unión a fH humano. Como se muestra en la **Figura 28**, las mutantes R41S, Q38A y A235G conservaron la unión al Acm JAR31 (panel B) y al Acm JAR 35 (panel C), lo que indica que los epítipos JAR31 y JAR35 se conservan en cada una de las mutantes R41S, Q38A y A235G.

Como se muestra en la **Figura 29, panel A**, las sustituciones sencillas Q126A, D201A y E202A en fHbp ID 22 no redujeron significativamente la unión a fH humano. Como se muestra en la **Figura 29, panel B**, las mutantes Q126A, D201A y E202A conservaron la unión al Acm JAR35, lo que indica que el epítipo JAR35 se conservó en cada una de estas mutantes.

5 El efecto de diversas sustituciones de aminoácidos simples y dobles sobre la capacidad de fHbp ID 1, ID 22 e ID 77 para unirse al fH humano y para unirse a diversos anticuerpos monoclonales se resume en las **Tablas 6 y 7**.

Tabla 6 – Mutaciones que reducen la unión a fH						
Antecedentes de variante de secuencia de fHbp (grupo modular*)	Mutación de aminoácido	Reducción en la unión a fH (Número de Figura)	Acm de reactividad anti-fHbp			
			JAR 5	JAR 4	JAR 31	JAR 35
ID 1 (I)	Ninguna (WT)	0	2	2	0	0
	R41S	>50 (F10)	2	2	NA	NA
	R41A	>50 (F10)	2	No hecho	NA	NA
	R130A	>50 (F15)	2	1	NA	NA
	H119A	>10(F15)	2	1	NA	NA
	E218A	>50 [†] (F4)	2	2	NA	NA
	E239A	>10 [†] (F4)	2	2	NA	NA
	E218A/E239A	>50 [†] (F4)	2	2	NA	NA
ID 4 (I) ID 9 (I) ID 74 (I)	R41S	>50 (F11)	2	2	NA	NA
	R41S	>50 (F11)	2	2	NA	NA
	R41S	>50 (F11)	2	2	NA	NA
ID 15 (IV)	Ninguna (WT)	0	2	0	0	0
	S41P	>50 (F17)	2	NA	0	NA
ID 22 (III)	Ninguna (WT)	0	0	2 [†]	2	2
	R80A	>50 (F23)	NA	0	2	2
	D211A	>50 (F23)	NA	2	2	2
	E218A	>50 (F23)	NA	2	2	2
	E248A	>50 (F23)	NA	1	2	2
	G236I	>50 (F27)	NA	0	1	2
	T221A/H223A	>50 (F27)	NA	2	2	2
ID 77 (VI)	Ninguna (WT)	0	0	2 [†]	2	0
	R41S/K113A	>10 (F21)	NA	1	2	NA
	R41S/K119A	>5 (F21)	NA	1	2	NA
	R41S/D121A	>10 (F21)	NA	1	2	NA
	R41S/K113A/D121A	>50 (F22)	NA	0	2	NA
*Grupo modular basado en los linajes de cinco segmentos variables, véase la Figura 16. Los grupos modulares I y IV son del grupo de variante 1 antigénico; los grupos modulares III y VI son del grupo de variante 2 antigénico. En comparación con la unión del Acm con la respectiva variante de secuencia; 0, sin unión significativa por el Acm; 1, unión reducida (reducción > 30 %); 2, unión similar o superior (reducción < 30 %). [†]JAR 4 se une aproximadamente un 30% menos a la variante 2 de fHbp (es decir, ID 22 o 77) que a la variante 1 (es decir, ID 1) [†]Figura 5 de la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0029621 **NA, no aplicable; para la reactividad de los Acm, el anticuerpo no se une a la respectiva variante de secuencia de tipo silvestre.						

Tabla 7. Mutaciones que no reducen significativamente la unión a fH						
Antecedentes de variante de secuencia de fHbp (grupo modular*)	Mutación de aminoácido	Reducción en la unión a fH (Número de Figura)	JAR5	Acm anti-fHbp		
				JAR4	JAR31	JAR35
ID 1 (I)	Ninguna (tipo silvestre)	0	2	2	0	0
	K241E	0 (F14)	2	2	NA	NA
	Q87A	0	2	2	NA	NA
	Q113A	0	2	2	NA	NA
	I114A/S117A	0	2	2	NA	NA
	G121R	0	2	2	NA	NA
ID 15 (IV)	Ninguna (tipo silvestre)	0	2	0	0	0
	E241K	0 (F14)	2	NA	NA	NA
ID 19 (VI)	Ninguna (tipo silvestre)	0	0	2		
	R41S	0 (F12)	NA	1	2	NA
ID 22 (III)	Q38A R41S	0 (F28)	NA	1	2	2
	A235G	0 (F28)	NA	1	2	2
		0 (F28)	NA	1	2	2
	Q126A	0 (F29)	NA	2	2	2
	D201A	0 (F29)	NA	1	1	2
	E202A	0 (F29)	NA	1	2	2
ID 77 (VI)	R41S	0 (F12)	NA	ND***	2	NA
	K113A	0 (F20)	NA	ND	2	NA
	K119A	0 (F20)	NA	ND	2	NA
	D121A	0 (F20)	NA	ND	2	NA
*Grupo modular basado en los linajes de cinco segmentos variables, véase la Figura 16. Los grupos modulares I y IV son del grupo de variante 1 antigénico; los grupos modulares III y VI son del grupo de variante 2 antigénico. *En comparación con la unión a fH por la respectiva variante de fHbp de tipo silvestre. ¶En comparación con la unión a la respectiva variante de secuencia de tipo silvestre; 0, sin unión significativa por el Acm; 1, unión reducida (reducción > 30 %); 2, unión similar o superior (reducción < 30 %). **NA, no aplicable; el Acm no se une a la respectiva variante de secuencia de tipo silvestre. ***ND, no ensayado						

Como se muestra en la Figura 30, panel A, las sustituciones sencillas E218A en fHbp ID 28 redujeron la unión a fH humano en comparación con la unión de fH por fHbp ID 28 de tipo silvestre. También como se muestra en la **Figura 30, panel A**, las sustituciones sencillas E197A, K245A y D201A en fHbp ID 28 no redujeron significativamente la unión a fH. La **Figura 30, panel B**, muestra la unión del antisuero ID28 anti-fHbp policlonal de ratón a las diversas proteínas (fHbp WT; sustituciones sencillas E197A, K245A y D201A en fHbp ID 28). Los datos presentados en la **Figura 30, panel B** indican que las diversas fHbp están presentes en la placa de ELISA en cantidades similares. Como se muestra en la **Figura 30, paneles C y D**, la mutante E218A se unió a los Acm JAR 31 y JAR 33, lo que indica que se conservan las configuraciones globales de los epítomos reconocidos por estos Acm.

La inmunogenicidad global de las fHbp mutantes puede determinarse mediante la administración de los mutantes como vacunas a los ratones de tipo silvestre cuyo fH nativo no se une a las vacunas mutantes o de tipo silvestre. Los datos generados en este modelo proporcionan una evaluación global de si los epítomos importantes para generar anticuerpos bactericidas en suero se retienen o no en la vacuna de mutante. Por ejemplo, la mutante E218A/E239A en fHbp ID1 eliminó la unión con fH humano, pero en múltiples estudios tuvo una capacidad alterada para generar respuestas de anticuerpos bactericidas en ratones WT (**Tabla 2**, anterior). Los experimentos de inmunogenicidad se llevan a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Los títulos de anticuerpos IgG y bactericidas se miden y se comparan con los niveles correspondientes encontrados en ratones que han recibido los correspondientes controles de tipo silvestre y/o negativos. Si los epítomos críticos necesarios para generar la

actividad bactericida son retenidos por la vacuna de mutante, se espera que los niveles de anticuerpo generados en los ratones de tipo silvestre no sean significativamente diferentes de los niveles generados por la vacuna de fHbp de tipo silvestre correspondiente.

5 EJEMPLO 15. INDUCCIÓN DE RESPUESTA BACTERICIDA POR VARIANTES DE FHBP

Los ratones BALB/c de tipo silvestre (cuyo fH no se une a la fHbp WT) se inmunizaron por vía intraperitoneal con tres dosis de vacunas de fHbp recombinante, con cada dosis separada por intervalos de tres semanas. Cada dosis contenía 10 µg de fHbp recombinante y 300 µg de Al(OH)₃ en un volumen de 100 µl (la composición de tampón final era histidina 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5). Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca tres semanas después de la tercera dosis.

Se midieron los títulos bactericidas en suero contra la cepa H44/76 (ID1) del grupo B o la cepa Ghana 04/07 (ID 22) del grupo W-135 usando un complemento humano empobrecido en IgG (Beernink *et al*, *J Immunology* 2011). La media geométrica de los títulos (GMT) no diferentes entre la vacuna de mutante y la respectiva vacuna WT no fueron significativamente diferentes ($p > 0,10$ mediante la prueba t en títulos transformados con $\log_{10}$).

Los datos se muestran en las **Figuras 31-33**. La **Figura 31** muestra los títulos bactericidas en suero de ratones inmunizados con mutantes de vacunas de fHbp ID 1 con unión reducida al fH humano. Cada símbolo representa el título de un ratón individual medido contra la cepa H44/76 del grupo B (ID 1). Las líneas horizontales representan la media geométrica de los títulos. Los respectivos GMT de cada una de las vacunas de mutante no fueron significativamente diferentes a los generados por la vacuna de fHbp WT ID1 ($p > 0,10$).

La **Figura 32** muestra los títulos bactericidas en suero de ratones inmunizados con vacunas de fHbp ID 22 mutante con unión reducida con el fH humano. Cada símbolo representa el título bactericida de un ratón individual medido contra la cepa Ghana 7/04 del grupo W-135 (ID 22). Las líneas horizontales representan la media geométrica de los títulos. Panel superior. Vacunas de mutantes (D211A, E218A, E248A y T221A/H223A) con GMT que no fueron significativamente diferentes a las de la vacuna de ID 22 WT ($p > 0,10$). Panel inferior, vacunas de mutantes (R80A y G236I) que produjeron GMT significativamente más bajas que las de la vacuna de ID 22 WT ($p < 0,05$).

La **Figura 33** muestra los títulos bactericidas en suero de ratones inmunizados con vacuna de fHbp ID 77 mutante con unión reducida con el fH humano. Cada símbolo representa el título bactericida de un ratón individual medido contra la cepa Ghana 7/04 del grupo W-135 (ID 22). Las líneas horizontales representan la media geométrica de los títulos. Los ratones inmunizados con la vacuna de triple mutante R41S/K113A/D121A ID 77 tenía GMT significativamente inferior a los de los ratones inmunizados con la vacuna de WT ($p < 0,05$).

La **Tabla 8** resume los datos de inmunogenicidad mostrados en las **Figuras 31-33**. La media geométrica de los títulos (GMT) no diferentes entre la vacuna de mutante y la respectiva WT no fueron significativamente diferentes ($p > 0,10$ según la prueba t en los títulos transformados con $\log_{10}$).

Tabla 8. Inmunogenicidad de fHbp mutantes con unión a fH reducida

fHbp ID	Vacuna de fHbp	Actividad bactericida		
		N.º de ratones	Cepa	Títulos frente a la WT respectiva
1	WT	14	H44/76	n/a
1	R41S	14	H44/76	No diferentes
1	R41A	14	H44/76	No diferentes
1	R130A	12	H44/76	No diferentes
1	E239A	12	H44/76	No diferentes
22	WT	10	Ghana 04/07	n/a
22	D211A	10	Ghana 04/07	No diferentes
22	E218A	10	Ghana 04/07	No diferentes
22	E248A	10	Ghana 04/07	No diferentes
22	T221A/H223A	10	Ghana 04/07	No diferentes

22	R80A	10	Ghana 04/07	Inferiores
22	G236I	10	Ghana 04/07	Inferiores
77	WT	12	Ghana 04/07	n/a
77	R41S/K113A/D121A	12	Ghana 04/07	Inferiores

EJEMPLO 16. ALINEACIONES DE SECUENCIAS

Las **Figuras 34 y 35** presentan una alineación de secuencias de aminoácidos de fHbp ID1 (SEQ ID NO: 1), fHbp ID 22 (SEQ ID NO: 2), fHbp ID 77 (SEQ ID NO: 4), fHbp ID 28 (SEQ ID NO: 3), y la quimera ID1/ID77 (SEQ ID NO: 8). ID 28 se muestra como una secuencia de referencia para el grupo de variante 3 de fHbp. Los restos de la superficie de contacto de unión al factor H (resaltados en gris) son según lo descrito en Schneider *et al.* ((2009) *Nature* 458:890-3) descritos como enlace de hidrógeno o interacciones iónicas. GEHT (SEQ ID NO: 27) en la posición 136 a 139 representa el punto de unión entre ID 1 e ID 77 para la fHbp quimérica.

Figura 35. Alineación de secuencias de aminoácidos de fHbp ID 1 (SEQ ID NO: 1), fHbp ID 22 (SEQ ID NO: 2), fHbp ID 77 (SEQ ID NO: 4), fHbp ID 28 (SEQ ID NO: 3) y quimera ID1/ID77 (SEQ ID NO: 8). Los restos resaltados en gris indican restos mutados y se resumen en la **Tabla 7**.

La **Tabla 9**, a continuación, resume la reactividad hacia los Acm de fHbp ID 1, ID 22, ID 77 e ID 28. **Tabla 9**

ID	Variante	Grupo modular	Reactividad de los Acm
1	1	I	JAR 4, JAR 5
22	2	III	JAR 4, JAR 31, JAR 35
77	2	VI	JAR 4, JAR 31, JAR 35
28	3	II	JAR 31, JAR 33

EJEMPLO 17. LA EFICACIA DE INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE FH/FHBP SE CORRELACIONA CON LA ACTIVIDAD BACTERICIDA; Y EL PAPEL DE NSPA

MATERIALES Y MÉTODOS

Acm anti-fHbp murinos. Se usaron las estirpes celulares de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales (Acm) específicos de fHbp murinos JAR 3 (IgG3), JAR 5 (IgG2b) y mAb502 (IgG2a; Giuliani *et al.* (2005) *Infect. Immun.* 73:1151; y Scarselli *et al.* (2009) *J. Mol. Biol.* 386:97). Los Acm de control incluían SEAM 12 (Granoff *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:5028), que reacciona con la cápsula del grupo B, y un P1.7 anti-PorA (código NIBSC 01/514, obtenido del Instituto Nacional de Patrones y Control Biológicos, Potters Bar, Reino Unido)..

Acm anti-fHbp de ratón quiméricos de IgG1 humana. Se convirtió ARN aislado de las células de hibridoma en ADNc usando un kit Omniscript RT (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se amplificó usando cebadores específicos de cadena pesada (H) y ligera (L) de inmunoglobulina (Wang *et al.* (2000) *Infect. Immun.* 68:1871) e insertado en el vector pGem (Promega) para la secuenciación. Basándose en las secuencias determinadas, se diseñaron cebadores específicos para facilitar la inserción de las secuencias murinas de VH y VL en un vector de expresión eucariota bicistrónico de FRT modificado (Invitrogen). Para cada anticuerpo, se insertó la secuencia de VL murina cadena abajo de una secuencia líder de cadena L kappa humana, y en marco con una secuencia constante de cadena L kappa humana. Se insertó la secuencia de VH murina cadena abajo de una secuencia líder de cadena H humana, y en marco con una secuencia de región constante de IgG1 humana completa. El vector utilizó una secuencia del segmento interno de entrada ribosomal (IRES) entre las secuencias VH y VL para facilitar la traducción equilibrada de ambas cadenas. Las secuencias de ADN de todas las construcciones se verificaron antes de la transfección.

Se sembraron en placas células CHO Flp-In (Invitrogen) a $3,5 \times 10^5$ células por pocillo (en 2 ml de medio Flp-In) en placas de 6 pocillos Nunclon Delta, y luego se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante la noche. Una vez que las células alcanzaron el 80 % de confluencia, se transfectaron con pOG44 y el vector FRT que contenía las inserciones de VH y VL (proporción 9:1) usando el reactivo de transfección Trans Fast (Promega). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se tripsinizaron las células y se sembraron en una nueva placa de 6 pocillos bajo selección del fármaco con 600 µg/ml de higromicina. Las células transfectadas se adaptaron a un cultivo en suspensión sin suero usando medio Excell 302 (Sigma Aldrich) y se cultivaron durante aproximadamente 2 semanas. El anticuerpo del sobrenadante del cultivo celular se concentró antes de la purificación usando una celda

agitada de 200 ml (Amicon) y aplicando presión de gas nitrógeno. El anticuerpo se purificó usando columnas de proteína G HiTrap (GE Healthcare), seguido de la diálisis extensa contra PBS. Se añadió BSA hasta una concentración final del 1 % y se almacenaron alícuotas a -30 °C.

ELISA. Las concentraciones de Acm quiméricos de ratón IgG1 humanos se determinaron mediante un ELISA de captura con anticuerpo específico anti-cadena κ humana de cabra (Biosource) unido a los pocillos de una placa de microtitulación. La IgG humana unida se detectó mediante el anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen). Las concentraciones de anticuerpo se asignaron por comparación con la unión dependiente de la concentración de un patrón de IgG1 humana (anticuerpo monoclonal de cadena κ de mieloma humano, Sigma). La unión de los Acm anti-fHbp a fHbp se midió mediante ELISA con fHbp recombinante en la placa. El anticuerpo de detección secundario era anticuerpo específico anti-cadena κ humana de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Biosource).

Resonancia de plasmón superficial. La cinética de unión de los Acm quiméricos humanos-de ratón a fHbp se midió mediante resonancia de plasmón superficial con fHbp recombinante inmovilizada (500 o 1000 unidades de respuesta) en chips CM5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), que se realizó mediante acoplamiento de amina (Kit de acoplamiento de amina, GE Healthcare). La cinética de unión se determinó a concentraciones de anticuerpos monoclonales que varían de 0,016 a 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 μM a 333 μM) usando un instrumento Biacore T/100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Unión a *N. meningitidis* por citometría de flujo. Se midió la unión de los Acm quiméricos a la superficie de bacterias encapsuladas vivas con la cepa H44/76 (B:15:P1.7,16; ST-32), que es un expresador relativamente alto de fHbp ID1 (Welsch *et al.* (2008) *J. Infect. Dis.* 197:1053; Welsch *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172:5606). En algunos experimentos, se probaron mutantes isogénicos desactivadas (KO) de H44/76 en las que no se expresaban fHbp, NspA o ambas proteínas. Los respectivos genotipos que fHbp:Erm, NspA:Spc y fHbp:Erm/NspA:Spc (Lewis *et al.* (2010) PLoS Pathog. 6:e1001027). El ensayo de unión se realizó como se ha descrito previamente excepto que los anticuerpos de ensayo o de control se incubaron junto con las células durante 1 hora a temperatura ambiente en lugar de 2 horas en hielo. El anticuerpo unido a la bacteria fue detectado por IgG anti-humana de cabra CF488A (BioTium).

Inhibición de la unión de fH. Se midió mediante ELISA la capacidad de los Acm anti-fHbp para inhibir la unión de fH a fHbp. Se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación con fHbp recombinante (2 $\mu\text{g/ml}$). Se añadieron diluciones de los Acm y se incubaron a 37 °C durante 2 horas, seguido de fH humano (Complement Tech), 2 $\mu\text{g/ml}$, que se incubó durante 1 hora más a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS-Tween 20 al 0,05 %, se detectó fH unido por un antisuero policlonal de oveja a fH (Abcam) seguido de anticuerpo IgG de burro anti-oveja (Sigma Aldrich) conjugado con fosfatasa alcalina. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición de la unión de fH en presencia de un Acm anti-fHbp en comparación con la unión de fH en ausencia del Acm.

Se midió la capacidad de los Acm anti-fHbp para inhibir la unión de fH a la superficie de células bacterianas vivas mediante citometría de flujo. Se incubaron bacterias H44/76 con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Acm anti-fHbp y diferentes concentraciones de fH purificado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las células, se detectó fH unido por un antisuero policlonal de oveja a fH (Lifespan Bioscience) seguido de anticuerpo IgG de burro anti-oveja (Invitrogen) conjugado con colorante Alexa Fluor 488 verde fluorescente. En algunos experimentos, se usó suero humano empobrecido en IgG al 20 %, que contenía 90 $\mu\text{g/ml}$ de fH, como fuente de fH humano. Para evitar la bacteriolisis, se calentó el suero humano durante 30 minutos a 56 °C para inactivar los componentes termolábiles del complemento esenciales para la bacteriolisis. Este tratamiento térmico no afectó a la actividad de fH.

Fuentes de complemento humano. La principal fuente de complemento para medir la actividad bactericida y la deposición de C4b fue el suero de un adulto sano con actividad hemolítica total normal del complemento y sin anticuerpos bactericidas en suero detectables contra la cepa de ensayo. Para eliminar los anticuerpos IgG no bactericidas, que podrían aumentar o inhibir la actividad de los Acm de ensayo, se agotó la fuente de complemento de IgG usando una columna de proteína G (HiTrap Protein G, GE Life Sciences, Piscataway, NJ). Se pasó una alícuota de 1 ml de suero humano sobre una columna de proteína G (1 ml de Protein G HiTrap, GE Life Sciences, Piscataway, NJ) equilibrada con PBS y se recogió la fracción de flujo continuo. Se controló la adecuación del empobrecimiento de IgG mediante un ELISA de captura de IgG, y se ensayó la actividad de CH50 con un ensayo comercial (kit de ensayo del Complemento CH50 EZ, Diamedix Corp., Miami, FL). Para evitar la bacteriolisis cuando se mide la deposición de C4b, se empobreció la fuente del complemento de C6 usando una columna de afinidad del complemento antihumano C6, como se ha descrito previamente (Plested y Granoff (2008) *Clin. Vaccine Immunol.* 15:7999). En algunos experimentos, se usaron fuentes comerciales de complemento humano que habían sido empobrecidas en fH o C1q (Complement Tech.), que también se habían empobrecido en IgG como se ha descrito anteriormente.

Ensayo bactericida en suero. La actividad bactericida se midió como se ha descrito previamente (Beernink *et al.* (2009) *J. Infect. Dis.* 199:1360) usando bacterias en fase logarítmica de la cepa H44/76 del grupo B y suero humano empobrecido en IgG al 20 % como fuente de complemento. Inmediatamente antes de realizar el ensayo, se centrifugaron los Acm anti-fHbp durante dos horas a 100.000 $\times$ g para eliminar los agregados. La actividad bactericida ($\text{BC}_{50\%}$) se definió por la concentración de Acm que produjo una disminución del 50 % en UFC/ml

después de una incubación de 60 minutos en la mezcla de reacción en comparación con las UFC/ml en los pocillos de control negativo en punto temporal cero.

Deposición de C4b dependiente de C1q en *N. meningitidis*. Se usó la citometría de flujo para medir la deposición de C4b humano en la superficie de bacterias vivas de la cepa H44/76 del grupo B. Las bacterias se cultivaron como se ha descrito anteriormente para el ensayo bactericida y se incubaron con suero humano empobrecido en C1q al 5 % (Complement Tech.) que también se había empobrecido en complemento C6 para evitar la bacteriolisis (véase más arriba). Se añadieron diferentes concentraciones de los anticuerpos Acm anti-fHbp humanos-de ratón con o sin 20 µg/ml de proteína C1q purificada (Complement Tech.). Se detectó C4b humano unido a bacterias con C4b antihumano conjugado con isotiocianato de fluorescencia (Meridian Life Science).

RESULTADOS

Los Acm JAR3 y JAR5 inhiben la unión entre sí a fHbp, y reconocen epítomos solapantes que incluyen glicina y lisina en las posiciones 121 y 122, respectivamente. Los respectivos epítomos reconocidos por los dos paratopos se diferenciaron en la unión diferente por transferencia Western con diferentes variantes de secuencia de aminoácidos de fHbp. Se derivaron hibridomas murinos JAR 3 y JAR 5 de los mismos genes de línea germinal de VH y VL, pero que diferían en la secuencia de sus respectivas regiones CDR (a excepción de VL CDR2). El mAb502 murino se codificó por diferentes genes de línea germinal VH y VL que los de JAR3 o JAR5. El mAb502 reconoce un epítomo de configuración que requiere una arginina en la posición 204, y no inhibe la unión de JAR3 o JAR5 a fHbp. Por lo tanto, mAb502 reconoce un epítomo de fHbp distinto de aquellos reconocidos por los Acm JAR. Los números de acceso del Genbank para los genes vL y vH de mAb502 son EU835941 y EU835942, respectivamente. Los números de acceso de GenBank para las regiones VL y VH de los anticuerpos JAR3 y JAR5 son los siguientes: JF715928, cadena pesada variable de JAR3; JF715929, cadena ligera variable de JAR3; JF715926, cadena pesada variable de JAR5; y JF715927, cadena ligera variable de JAR5.

Figura 36. Modelo de fHbp en un complejo con un fragmento de fH, basado en las coordenadas de la estructura cristalina (Schneider *et al.* (2009) *Nature* 458:890). La relación espacial de los restos de aminoácidos sobre los que previamente se había informado que afectan a la unión de mAb502 anti-fHbp, y JAR 3 y JAR 5 al fragmento fH de fHbp, gris claro, se muestra en complejo con fHbp.

Los tres Acm anti-fHbp quiméricos de ratón IgG1 humanos tienen características de unión similares. Se construyeron tres anticuerpos anti-fHbp quiméricos de ratón-ser humano, en los que se aparearon cada uno de los paratopos JAR 3, JAR 5 y mAb502 con una región constante de IgG1 humana. En un ELISA con fHbp recombinante adsorbido en los pocillos de una placa de microtitulación, los tres Acm mostraron una unión respectiva similar (**Figura 37, Panel A**). Mediante resonancia de plasmón superficial, las cinéticas respectivas de unión con 200, 500 o 1.000 UR de fHbp inmovilizada fueron similares para los tres Acm, que se ensayaron cada uno a concentraciones de 0,016 a 2,25 µg/ml. Los datos representativos para 0,25 µg/ml (1,7 µM) de los Acm y 1000 UR de fHbp ID 1 inmovilizado se muestran en el Panel B. Aunque mAb502 mostró menor unión máxima a fHbp que JAR 3 o JAR 5, las respectivas velocidades de asociación, K_a , eran similares ($4.25E + 06$, $2.26E + 06$ y $1.19E + 06$, para JAR 3, JAR 5 y mAb502, respectivamente). Las velocidades de disociación fueron lentas para los tres Acm, lo que impidió el cálculo de las constantes de disociación exactas. El orden de magnitud de los valores de K_d para cada uno de los Acm fue E-05.

Se midió la unión de los Acm a la superficie de bacterias vivas de la cepa H44/76 del grupo B mediante citometría de flujo de fluorescencia indirecta. A concentraciones de Acm de entre 0,8 y 40 µg/ml, la unión respectiva de los tres Acm fue indistinguible entre sí. Los resultados de unión obtenidos con 4 µg/ml se muestran en la **Figura 37**, Panel C. La unión no se vio afectada por la presencia de suero humano empobrecido en IgG al 20 % de inactivado por calor, que contenía ~90 µg/ml de fH humano (en comparación con la **Figura 37**, Panel D con la **Figura 37**, Panel C).

Figuras 37-D. Unión de Acm específicos de fHbp a fHbp. A. ELISA. La IgG unida se detectó con un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina específica de cadena ligera kappa antihumano. B. Resonancia de plasmón superficial. Unión de Acm anti-fHbp (0,25 µg/ml) a fHbp recombinante inmovilizada (1000 UR). C. Citometría de flujo. Unión de Acm anti-fHbp (4 µg/ml) con células bacterianas vivas de la cepa H44/76 del grupo B de *N. meningitidis*. JAR 3, línea negra punteada; JAR 5, línea gris; mAb502, línea negra. Un Acm irrelevante (100 µg/ml) fue un control negativo (histograma relleno de gris). Las curvas de unión de los tres Acm anti-fHbp están superpuestas. D. Citometría de flujo. Mismas concentraciones de Acm que en el Panel C con la adición de un suero humano empobrecido en IgG al 20 % como fuente de fH humano (~90 µg/ml).

Los tres Acm quiméricos de ratón-humanos activan la vía del complemento clásico humano, pero solo JAR 3 y JAR 5 tienen actividad bactericida. La activación de la vía clásica del complemento se inicia cuando la IgG se une a la superficie bacteriana y hay suficiente complejo de antígeno-anticuerpo para permitir que las regiones Fc próximas del anticuerpo se conecten con C1q, que, a su vez, activa C4b. La unión de C4b a la superficie de células vivas de *N. meningitidis* de la cepa H44/76 del grupo B se midió como un sustituto para la unión de C1q y la activación de C4b, y como un marcador para la activación de la vía del complemento clásico.

Cuando la fuente de complemento era suero humano empobrecido en C1q al 5 % que también había sido empobrecido en IgG, hubo una deposición de C4b despreciable generada por los Acm anti-fHbp (**Figura 38, Panel A**). Cuando se añadieron de nuevo 20 µg/ml de C1q purificado a la mezcla de reacción, cada uno de los Acm activó la deposición de C4b (**Figura 38, Panel B**). Aunque la unión de cada uno de los Acm activó la vía clásica del complemento, solo JAR 3 y JAR 5 tenían actividad bactericida mediada por el complemento (**Figura 38, Panel C**). Las concentraciones medias $\pm$ ET para una destrucción del 50 % en tres ensayos fueron $9 \pm 0,85$ µg/ml para JAR 3; 15 ± 2 µg/ml para JAR 5 ($p = 0.024$) y > 100 µg/ml para mAb502 ($p < 0,0003$ en comparación con JAR 3 o JAR 5).

Figuras 38A-C. Activación del complemento dependiente de C1q en bacterias del grupo B encapsuladas de la cepa H44/76. A. Citometría de flujo. Activación de la deposición de C4b por 4 µg/ml de Acm y complemento (suero humano empobrecido en IgG al 5 %) que se había empobrecido en C1q. Acm anti-fHbp JAR 3, línea negra punteada; JAR 5, línea gris; mAb502, línea negra, y un Acm humano irrelevante (100 µg/ml, histograma relleno de gris) (los datos para cada uno se superponen). B. Citometría de flujo. Los mismos símbolos y condiciones que en el Panel A excepto la adición de 20 µg/ml de proteína C1q purificada a las reacciones. C. Actividad bactericida. Supervivencia de bacterias después de la incubación durante 60 minutos a 37 °C con cada uno de los Acm y complemento (suero humano empobrecido en IgG al 20 %).

Los Acm quiméricos JAR3 y JAR5, pero no mAb502, inhiben la unión de fH. En estudios previos, los Acm murinos JAR3 y JAR5 inhibieron la unión de fH a fHbp, mientras que el mAb502 murino no inhibió la unión a fH. Mediante ELISA, los Acm JAR3 y JAR5 quiméricos IgG1 humanos también inhibieron la unión de fH a fHbp mientras que el mAb502 quimérico no inhibió la unión a fH (**Figura 39, Panel A**). Cuando el suero humano empobrecido en IgG al 20 % inactivado por calor era la fuente de fH, 50 µg/ml de JAR 3 o JAR 5 quiméricos, pero no mAb502, inhibieron la unión de fH a la superficie de células bacterianas vivas (**Figura 39, Panel B**). Tan solo 2 µg/ml de JAR3 o JAR5 también inhibieron la unión de fH (Panel C), aunque la inhibición fue menos completa que con 50 µg/ml del Acm (Panel B).

Figuras 39A-C. Inhibición de la unión de fH por Acm anti-fHbp. A. ELISA: fH (4 µg/ml) con fHbp recombinante en fase sólida. B y C. Citometría de flujo, con células bacterianas vivas de la cepa H44/76 del grupo B; Zona rellena de gris claro, bacterias con fH (~90 µg/ml) en suero humano empobrecido en IgG al 20 % sin un Acm; línea negra continua, bacterias con fH + mAb502 en suero, 50 µg/ml; línea negra punteada, bacterias con fH + JAR 3 en suero, 50 µg/ml; línea continua gris, bacterias con fH + JAR 5 en suero, 50 µg/ml; zona rellena de gris oscuro, bacterias sin fH o Acm como control negativo. La unión de fH se detectó con un anticuerpo de oveja específico de fH. C. Mismas condiciones que en el Panel B, excepto que se ensayaron 2 µg/ml de cada uno de los Acm anti-fHbp en lugar de 50 µg/ml.

La correlación observada entre la actividad bactericida y la inhibición de Acm de la unión a fH no probó necesariamente que la inhibición fuera responsable de la mayor actividad bactericida de JAR 3 o JAR 5 que mAb502. Por ejemplo, las relaciones espaciales de epítomos de fHbp en la superficie de las bacterias que son reconocidas por los Acm anti-fHbp que inhiben la unión a fH son diferentes a las de los epítomos reconocidos por los Acm anti-fHbp que no inhiben la unión de fH (compárense, por ejemplo, las posiciones de los restos de aminoácidos sobre los que se ha informado previamente que afectan a la unión de mAb502 (Scarselli *et al.* (2009) *J Mol Biol* 386:97-108) con los de JAR 3 y JAR 5 (Beernink *et al.* (2008) *Infect Immun* 76:4232-4240) (**Figura 36**). Estas diferencias espaciales podrían afectar potencialmente a la formación de un complejo funcional de ataque de membrana independiente de la regulación por disminución de fH.

Para determinar si las diferencias en las ubicaciones de los respectivos epítomos afectaban a la actividad bactericida independiente de la inhibición de fH, se midió la actividad bactericida anti-fHbp con el complemento empobrecido en fH (suero humano al 20 % que también se había empobrecido en IgG). En ausencia de fH, los tres Acm mostraron una actividad bactericida mediada por el complemento similar ($BC_{50\%}$, 1,2 a 1,4 µg/ml, **Tabla 10**). Por el contrario, cuando se añadió fH humano purificado a la mezcla de reacción, mAb502 ya no era bactericida ($BC_{50\%} > 100$ µg/ml, Panel B). La adición de fH a la mezcla de reacción también redujo la actividad bactericida de dos anticuerpos Acm de control reactivos con la cápsula del grupo B o PorA (compárense los valores respectivos de $BC_{50\%}$ medidos con el complemento empobrecido en fH, Panel C, con aquellos con complemento enriquecido en fH, Panel C), pero el efecto del enriquecimiento en fH fue menos pronunciado que con los Acm anti-fHbp.

Tabla 10. Actividad bactericida de Acm anti-fHbp medida con complemento humano empobrecido en fH

	Actividad bactericida ($BC_{50\%}$ µg/ml)*			
	Complemento empobrecido en fH		Complemento enriquecido en fH	
	Media	Intervalo	Media	Intervalo
Acm IgG1 anti-fHbp de ratón quiméricos humanos				
JAR 3	1,4	0,8 - 2,0	15,2	12,5 - 18

JAR 5	1,25	1,0 - 1,5	23,5	22 - 25
mAb502	1,25	0,75 - 1,5	>100	>100
I Acm IgG2a de ratón de control				
P1.7 anti-PorA	0,5	0,3 - 0,7	1,05	1,0 - 1,1
Anti-capsular, SEAM 12	0,18	0,15 - 0,2	1,15	1,0 - 1,2
*Los datos son la media y los respectivos intervalos de las concentraciones de los Acm que dieron el 50 % de destrucción tras 1 h de incubación con complemento (BC _{50%}) en dos ensayos independientes. Para el complemento empobrecido en fH, se añadieron 50 µg/ml de fH.				

La eliminación de la unión de fH a NspA potencia la actividad bactericida de los Acm anti-fHbp JAR 3 y JAR 5, pero no mAb502. Las concentraciones mucho más bajas de Acm anti-fHbp requeridas para la bacteriolisis con complemento empobrecido en fH en lugar de complemento enriquecido en fH sugirieron que cuando estaba presente fH, la inhibición de la unión de fH por JAR 3 o JAR 5 era incompleta (por ejemplo, debido a la unión de fH por un segundo ligando meningocócico tal como NspA (Lewis *et al.* (2010) *PLoS Pathog.* 6:e1001027). Para investigar la unión de fH independiente de la unión al ligando fHbp, se midió la unión de fH con un mutante isogénico de la cepa H44/76 del grupo B, en el que el gen que codificaba fHbp se había inactivado (cepa fHbp KO). Un segundo mutante en el que tanto los genes de fHbp como de NspA se habían inactivado sirvió como control para un posible efecto contributivo de NspA.

Mediante citometría de flujo, los dos mutantes y la cepa parental mostraron una unión respectiva similar con un Acm P1.7 anti-PorA murino de control (**Figura 40, Panel A**). Como era de esperar, hubo mucha menos unión de fH (100 µg/ml) con el mutante fHbp KO que con la cepa WT (compárese la línea negra con la línea gris en la **Figura 40, Panel B**). En ausencia de la expresión tanto de fHbp como de NspA (línea discontinua), la unión de fH era indistinguible de las bacterias de control negativo WT sin adición de fH (histograma relleno de gris claro). Se obtuvieron resultados respectivos similares cuando se usó suero humano empobrecido en IgG al 20 % como fuente de fH (**Figura 40, Panel C**).

Figuras 40A-C. Unión de fH a mutantes de H44/76 del grupo B con inactivación genética de la expresión de fHbp o expresión tanto de fHbp como de NspA. A. *Acm anti-PorA* (P1.7, 20 µg/ml). Línea negra, WT; línea gris, fHbp KO; línea punteada, fHbp KO combinada con NspA KO. B. Unión de fH humano purificado (100 µg/ml). Designación como en el panel A. C. Unión de fH en suero humano (20 %, empobrecido en IgG). Designación como en el Panel A. Los resultados se replicaron en dos ensayos independientes.

Para determinar una posible contribución de la unión de fH a NspA (y la regulación por disminución correspondiente de la activación del complemento) a las altas concentraciones de Acm anti-fHbp requeridas para la bacteriolisis en presencia de fH, se midió la actividad bactericida anti-fHbp con un mutante NspA KO isogénico (**Figura 41**). Con JAR 3 o JAR 5 quimérico, que inhibía la unión de fH a fHbp, hubo una destrucción significativamente mayor del mutante NspA KO que la cepa WT de control (**Figura 41, Paneles A y B**, respectivamente). Por el contrario, mAb502 quimérico, que no inhibió la unión a fH, no tuvo actividad bactericida contra ninguna de las cepas (**Figura 41, Panel C**). Dos Acm de ratón de control, anti-PorA y anti-capsular, mostraron una actividad bactericida respectiva similar contra las cepas WT y mutante NspA KO (**Figura 41, Paneles D y E**, respectivamente).

Figuras 41A-E. Actividad bactericida de Acm anti-fHbp medidos frente a un mutante de H44/76 del grupo B con inactivación genética de la expresión de NspA. La supervivencia de las bacterias después de la incubación durante 60 minutos a 37 °C con cada uno de los Acm y suero humano al 20 % empobrecido en IgG como fuente de complemento. Triángulos vacíos, mutante NspA KO; triángulos rellenos, cepa WT de control. A. JAR 3 quimérico. B. JAR 5 quimérico. C. mAb502 quimérico. D. Acm anti-Por A murino de control (P 1.7). E. Acm murino de control, SEAM 12, reactivo con la cápsula del grupo B. Los resultados son de tres diluciones independientes de los Acm realizadas en dos experimentos. Cuando se indica, la supervivencia respectiva para las cepas WT y NspA KO incubadas en la dilución de Acm fue significativamente diferente (**p* <0,02; ***p* <0,001).

Importancia de la unión de fH por fHbp en la actividad bactericida del Acm anti-NspA. Como se ha indicado anteriormente, usando un mutante NspA KO de la cepa H44/76 del grupo B, los datos mostraron que, en ausencia de fH unido a NspA, los Acm anti-fHbp que inhibían la unión a fH (JAR 3 o JAR 5) tenían mayor actividad bactericida que cuando se ensayo contra una cepa de tipo silvestre con expresión de NspA. También se realizó el experimento inverso: se ensayó un Acm AL12 anti-NspA (Moe *et al.*, *Infect. Immun.* (2002) 70:6021) contra un mutante desactivado fHbp de una cepa del grupo A (Senegal 1/99). Como se muestra en la **Figura 42**, el mutante fHbp KO era 50 veces más susceptible a la muerte por el Acm anti-NspA que la cepa WT. Por el contrario, no hubo una mejora significativa de la susceptibilidad del mutante fHbp KO a la muerte por un Acm de control contra P1.9 PorA. La actividad bactericida de los Acm se midió con complemento humano (suero humano empobrecido en IgG).

Otros datos adicionales sobre la inhibición de fH por los anticuerpos anti-fHbp son importantes para la actividad bactericida. Ocho de nueve aislamientos meningocócicos africanos ensayados eran susceptibles a la actividad bactericida de un antisuero de ratones inmunizados con una vacuna de vesículas de membrana externa nativa prototipo (NOMV) preparada a partir de un mutante de la cepa H44/76 del grupo B con fHbp ID 1 sobreexpresada (**Tabla 11**). Por el contrario, los nueve aislados fueron resistentes al antisuero de ratones inmunizados con la vacuna recombinante de fHbp ID 1 (títulos bactericidas < 1:10) y solo uno de los nueve aislamientos fue destruido por el antisuero de control de ratones inmunizados con la vacuna de NOMV del mutante fHbp KO (X5, título 1:36). La mezcla del antisuero de fHbp KO de NOMV con el antisuero con la vacuna recombinante de fHbp ID 1 no aumentó la actividad bactericida contra ninguna de las cepas de ensayo (Tabla 11). Por lo tanto, los anticuerpos anti-fHbp generados por la vacuna NOMV con fHbp sobreexpresada parecían ser responsables de la actividad bactericida contra los aislados con variantes de secuencia de fHbp que no coincidían con la fHbp ID 1 en la vacuna de NOMV. Tampoco hubo evidencia de actividad bactericida cooperativa éntrelos anticuerpos contra fHbp y anticuerpos contra otros antígenos en la vacuna de NOMV.

Tabla 11. Actividad bactericida de sueros de ratones inmunizados con una vacuna de vesículas de membrana externa nativas de la cepa del grupo B H44/76 con fHbp ID 1 sobreexpresada

Cepa de ensayo (fHbp. ID)*	1/título en suero de vacuna de fHbp recombinante		1/título en suero de vacuna de NOMV	
	fHbp homóloga*	fHbp ID 1	fHbp KO	fHbp ID 1 sobreexpresada
A3 (ID 5)	<10	<10	<10	132
A14 (ID 5)	<10	<10	<10	114
W1 (ID 9)	<10	<10	<10	<10
W3 (ID 9)	818	<10	<10	43
X3 (ID 74)	12.204	<10	<10	574
X5 (ID 74)	4066	<10	36	640
X7 (ID 74)	7680	<10	<10	324
Las cepas A3 y A14 son grupo capsular A, W1 y W3 son grupo capsular W-135, y X3, X5 y X7 son grupo capsular X; todas las cepas eran aislados clínicos de pacientes con enfermedad meningocócica de África subsahariana.				
Actividad bactericida (complemento humano) de sueros almacenados de ratones inmunizados en un estudio publicado previamente (Koeberling, <i>Vaccine</i> 2007, <i>supra</i>) con vacunas de fHbp recombinante o NOMV preparadas de mutantes de la cepa H44/76 del grupo B con sobreexpresión de fHbp ID 1. Los títulos son las medias de la dilución del suero para una reducción del 50 % en UFC/ml tras una h de incubación con complemento humano medida en al menos dos ensayos independientes.				
**Título con la respectiva vacuna de fHbp recombinante ID 5, 9 o 74 del de la cepa de ensayo.				

La amplia actividad bactericida anti-fHbp de reacción cruzada en suero inducida por la vacuna de NOMV mutante está asociada con respuestas de anticuerpos anti-fHbp más elevadas y un mayor bloqueo de la unión de fH a fHbp que la vacuna de fHbp recombinante. Mediante ELISA, los ratones inmunizados con la vacuna de NOMV del mutante con fHbp ID 1 sobreexpresada tuvieron concentraciones de anticuerpo anti-fHbp ID 1 en suero mayores que los ratones inmunizados con la vacuna de fHbp ID 1 recombinante (medias geométricas respectivas de 2.203 y 746 U/ml, $p < 0,02$, **Figura 43**, Panel A). Mediante ELISA, los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna de NOMV mutante también mostraron una mayor inhibición de la unión de fH a fHbp ID 4, que era la variante de secuencia expresada por las cepas del grupo A (**Figura 43**, Panel B, $p < 0,05$ en cada dilución ensayada). El aumento de la inhibición de fH no fue solo resultado de las concentraciones en suero de anti-fHbp más altas en el grupo de vacuna de NOMV mutante, porque, como media, la concentración de anticuerpos anti-fHbp requerida para la inhibición de fH en este grupo fue casi 4 veces menor que en el grupo de vacuna fHbp ID 1 recombinante (respectivas medias geométricas de 1,17 frente a 4,04 U/ml, $p < 0,05$, **Figura 43**, Panel C).

Figura 43, Panel A Respuestas del anticuerpo anti-fHbp a la vacunación según lo medido por ELISA (Panel A), y la capacidad de los anticuerpos anti-fHbp en suero para inhibir la unión de fH a fHbp (Paneles B y C, también mediante ELISA). Los ratones se inmunizaron con vacuna de fHbp ID1 recombinante (triángulos rellenos) o vacunas de NOMV preparadas a partir de mutantes de la cepa H44/76 del grupo B con sobreexpresión de fHbp ID 1 (círculos vacíos) o una fHbp desactivada (círculos rellenos). Para la vacuna de fHbp recombinante y la vacuna de NOMV con fHbp ID 1 sobreexpresada, cada símbolo (Panel A y C) representa el resultado de un ratón individual (10 ratones por grupo de vacuna). Para la vacuna NOMV fHbp KO, cada símbolo representa los resultados del ensayo de los sueros combinados de 3 a 4 animales individuales. **A)** Concentraciones de anticuerpo anti-fHbp ID 1 en unidades arbitrarias por ml. El grupo de vacuna de NOMV OE tuvo una mayor media geométrica de la concentración (línea horizontal) que los ratones inmunizados con la vacuna de fHbp recombinante ($p = 0,02$). **B)** Inhibición de la unión de fH a fHbp

ID 4, que era heteróloga a fHbp ID 1 en las vacunas. En todas las diluciones, la actividad inhibidora media del grupo que recibió la vacuna de NOMV del mutante con fHbp sobreexpresado (círculos vacíos) fue mayor que el grupo de vacuna de fHbp recombinante (triángulos rellenos, $p < 0,05$). C) Concentración de anticuerpo anti-fHbp ID 1 en suero para una inhibición del 50 % de la unión de fH a fHbp ID 4 (96 % de identidad de aminoácidos con ID 1). La media geométrica de la concentración de anticuerpos anti-fHbp para el 50 % de inhibición de la unión de fH fue menor para el grupo de NOMV OE fHbp (círculos vacíos) que para el grupo de vacuna de fHbp recombinante (triángulos rellenos, $p < 0,05$).

Listado de secuencias

- 10
- <110> Novartis vaccines and Diagnostics, SRL childrens Hospital and Research Center Oakland Beernink, Peter GRANOFF, DAN M Pajon Feyt, Rolando
- 15 <120> Proteínas de unión al factor H (fHbp) con propiedades alteradas y métodos de uso de las mismas
- <130> CHOR-057WO
- <150> US 61/440.227
- 20 <151> 07-02-2011
- <150> US 61/423.757
- 25 <151> 16-12-010
- <150> US 61/381.025
- <151> 08-09-2010
- <150> US 61/334.542
- 30 <151> 13-05-2010
- <150> US 61/319.181
- 35 <151> 30-03-2010
- <160> 31
- <170> FastSEQ para windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 255
- <212> PRT
- 40 <213> *Neisseria meningitidis*
- <400> 1

ES 2 661 569 T3

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1 20 35 50 65 80 95 110 125 140 155 170 185 195 210 225 240 255
Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu
Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp

Leu Ala Ala 180 185 190
195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln

<210> 2
<211> 254
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 2

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1 20 35 50 65 80 95 110 125 140 155 170 185 195 210 225 240 250
Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu
Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser
Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp
Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly
Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln

<210> 3
<211> 262
<212> PRT
<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 3

ES 2 661 569 T3

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

<210> 4
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 <400> 5

ES 2 661 569 T3

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
 1 Ile Gly Ala Gly 5 Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu 15 His Lys
 20 Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn
 35 Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Arg Thr Phe Lys Ala
 50 Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
 65 Ile Ser Arg Phe Asp 70 Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu
 85 Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser
 100 Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser
 115 Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Val Gly
 130 Glu His Thr Ser Phe Gly Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr
 145 Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr
 165 Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu
 180 Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro
 195 Asp Glu Lys His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln
 210 Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln
 225 Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His
 245 Ile Gly Leu Ala Lys Gln
 260

<210> 6
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 6

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
 1 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
 20 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
 35 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
 50

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
 65 Gln Ile Glu Val Asn 70 Gly Gln Leu Ile Thr 75 Leu Glu Ser Gly Glu Phe
 85 Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu
 100 Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Arg Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
 115 Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
 130 Pro Lys Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
 145 Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
 165 Gly Tyr Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp
 180 Leu Ala Ala Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys His His Ala Val Ile
 195 Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
 210 Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
 225 Lys Thr Ala Asn Gly Ile Arg His Ile Gly 235 Leu Ala Ala Lys Gln
 245

<210>
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 7

ES 2 661 569 T3

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

245

250

255

<210> 8
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Quimera fHbp ID 1 y ID 77

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 1231
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 661 569 T3

<400> 9

Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys
 1 Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile
 20 25 30
 Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala
 35 40 45
 Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Val Ile Met
 50 55 60
 Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys
 65 70 75 80
 Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe

85 90 95
 Thr Leu Thr Gly Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr
 100 105 110
 Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu
 115 120 125
 Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val
 130 135 140
 Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser
 145 150 155 160
 Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe
 165 170 175
 Val Cys Asn Ser Gly Tyr Lys Ile Glu Gly Asp Glu Glu Met His Cys
 180 185 190
 Ser Asp Asp Gly Phe Trp Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Val Glu Ile
 195 200 205
 Ser Cys Lys Ser Pro Asp Val Ile Asn Gly Ser Pro Ile Ser Gln Lys
 210 215 220
 Ile Ile Tyr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Gln Tyr Lys Cys Asn Met Gly
 225 230 235 240
 Tyr Glu Tyr Ser Glu Arg Gly Asp Ala Val Cys Thr Glu Ser Gly Trp
 245 250 255
 Arg Pro Leu Pro Ser Cys Glu Glu Lys Ser Cys Asp Asn Pro Tyr Ile
 260 265 270
 Pro Asn Gly Asp Tyr Ser Pro Leu Arg Ile Lys His Arg Thr Gly Asp
 275 280 285
 Glu Ile Thr Tyr Gln Cys Arg Asn Gly Phe Tyr Pro Ala Thr Arg Gly
 290 295 300
 Asn Thr Ala Lys Cys Thr Ser Thr Gly Trp Ile Pro Ala Pro Arg Cys
 305 310 315 320
 Thr Leu Lys Pro Cys Asp Tyr Pro Asp Ile Lys His Gly Gly Leu Tyr
 325 330 335
 His Glu Asn Met Arg Arg Pro Tyr Phe Pro Val Ala Val Gly Lys Tyr
 340 345 350
 Tyr Ser Tyr Cys Asp Glu His Phe Glu Thr Pro Ser Gly Ser Tyr
 355 360 365
 Trp Asp His Ile His Cys Thr Gln Asp Gly Trp Ser Pro Ala Val Pro
 370 375 380
 Cys Leu Arg Lys Cys Tyr Phe Pro Tyr Leu Glu Asn Gly Tyr Asn Gln
 385 390 395 400
 Asn Tyr Gly Arg Lys Phe Val Gln Gly Lys Ser Ile Asp Val Ala Cys
 405 410 415
 His Pro Gly Tyr Ala Leu Pro Lys Ala Gln Thr Thr Val Thr Cys Met
 420 425 430
 Glu Asn Gly Trp Ser Pro Thr Pro Arg Cys Ile Arg Val Lys Thr Cys
 435 440 445
 Ser Lys Ser Ser Ile Asp Ile Glu Asn Gly Phe Ile Ser Glu Ser Gln
 450 455 460
 Tyr Thr Tyr Ala Leu Lys Glu Lys Ala Lys Tyr Gln Cys Lys Leu Gly
 465 470 475 480
 Tyr Val Thr Ala Asp Gly Glu Thr Ser Gly Ser Ile Thr Cys Gly Lys
 485 490 495
 Asp Gly Trp Ser Ala Gln Pro Thr Cys Ile Lys Ser Cys Asp Ile Pro
 500 505 510
 Val Phe Met Asn Ala Arg Thr Lys Asn Asp Phe Thr Trp Phe Lys Leu
 515 520 525
 Asn Asp Thr Leu Asp Tyr Glu Cys His Asp Gly Tyr Glu Ser Asn Thr
 530 535 540
 Gly Ser Thr Thr Gly Ser Ile Val Cys Gly Tyr Asn Gly Trp Ser Asp
 545 550 555 560
 Leu Pro Ile Cys Tyr Glu Arg Glu Cys Glu Leu Pro Lys Ile Asp Val
 565 570 575
 His Leu Val Pro Asp Arg Lys Lys Asp Gln Tyr Lys Val Gly Glu Val
 580 585 590

ES 2 661 569 T3

Leu Lys Phe Ser Cys Lys Pro Gly Phe Thr Ile Val Gly Pro Asn Ser
 Val Gln Cys Tyr His Phe Gly Leu Ser Pro Asp Leu Pro Ile Cys Lys
 Glu Gln Val Gln Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Leu Leu Asn Gly Asn
 Val Lys Glu Lys Thr Lys Glu Glu Tyr Gly His Ser Glu Val Val Glu
 Tyr Tyr Cys Asn Pro Arg Phe Leu Met Lys Gly Pro Asn Lys Ile Gln
 Cys Val Asp Gly Glu Trp Thr Thr Leu Pro Val Cys Ile Val Glu Glu
 Ser Thr Cys Gly Asp Ile Pro Glu Leu Glu His Gly Trp Ala Gln Leu
 Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Glu Phe Asn Cys Ser
 Glu Ser Phe Thr Met Ile Gly His Arg Ser Ile Thr Cys Ile His Gly
 Val Trp Thr Gln Leu Pro Gln Cys Val Ala Ile Asp Lys Leu Lys Lys
 Cys Lys Ser Ser Asn Leu Ile Ile Leu Glu Glu His Leu Lys Asn Lys
 Lys Glu Phe Asp His Asn Ser Asn Ile Arg Tyr Arg Cys Arg Gly Lys
 Glu Gly Trp Ile His Thr Val Cys Ile Asn Gly Arg Trp Asp Pro Glu
 Val Asn Cys Ser Met Ala Gln Ile Gln Leu Cys Pro Pro Pro Pro Gln
 Ile Pro Asn Ser His Asn Met Thr Thr Thr Leu Asn Tyr Arg Asp Gly
 Glu Lys Val Ser Val Leu Cys Gln Glu Asn Tyr Leu Ile Gln Glu Gly
 Glu Glu Ile Thr Cys Lys Asp Gly Arg Trp Gln Ser Ile Pro Leu Cys
 Val Glu Lys Ile Pro Cys Ser Gln Pro Pro Gln Ile Glu His Gly Thr
 Ile Asn Ser Ser Arg Ser Ser Gln Glu Ser Tyr Ala His Gly Thr Lys
 Leu Ser Tyr Thr Cys Glu Gly Gly Phe Arg Ile Ser Glu Glu Asn Glu
 Thr Thr Cys Tyr Met Gly Lys Trp Ser Ser Pro Pro Gln Cys Glu Gly
 Leu Pro Cys Lys Ser Pro Pro Glu Ile Ser His Gly Val Val Ala His
 Met Ser Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Glu Glu Val Thr Tyr Lys Cys Phe
 Glu Gly Phe Gly Ile Asp Gly Pro Ala Ile Ala Lys Cys Leu Gly Glu
 Lys Trp Ser His Pro Pro Ser Cys Ile Lys Thr Asp Cys Leu Ser Leu
 Pro Ser Phe Glu Asn Ala Ile Pro Met Gly Glu Lys Lys Asp Val Tyr
 Lys Ala Gly Glu Gln Val Thr Tyr Thr Cys Ala Thr Tyr Tyr Lys Met
 Asp Gly Ala Ser Asn Val Thr Cys Ile Asn Ser Arg Trp Thr Gly Arg
 Pro Thr Cys Arg Asp Thr Ser Cys Val Asn Pro Pro Thr Val Gln Asn
 Ala Tyr Ile Val Ser Arg Gln Met Ser Lys Tyr Pro Ser Gly Glu Arg
 Val Arg Tyr Gln Cys Arg Ser Pro Tyr Glu Met Phe Gly Asp Glu Glu
 Val Met Cys Leu Asn Gly Asn Trp Thr Glu Pro Pro Gln Cys Lys Asp

 Ser Thr Gly Lys Cys Gly Pro Pro Pro Ile Asp Asn Gly Asp Ile
 Thr Ser Phe Pro Leu Ser Val Tyr Ala Pro Ala Ser Ser Val Glu Tyr
 Gln Cys Gln Asn Leu Tyr Gln Leu Glu Gly Asn Lys Arg Ile Thr Cys
 Arg Asn Gly Gln Trp Ser Glu Pro Pro Lys Cys Leu His Pro Cys Val
 Ile Ser Arg Glu Ile Met Glu Asn Tyr Asn Ile Ala Leu Arg Trp Thr
 Ala Lys Gln Lys Leu Tyr Ser Arg Thr Gly Glu Ser Val Glu Phe Val
 Cys Lys Arg Gly Tyr Arg Leu Ser Ser Arg Ser His Thr Leu Arg Thr
 Thr Cys Trp Asp Gly Lys Leu Glu Tyr Pro Thr Cys Ala Lys Arg
 1090 1095 1100
 1105 1110 1115 1120
 1125 1130 1135
 1140 1145 1150
 1155 1160 1165
 1170 1175 1180
 1185 1190 1195 1200
 1205 1210 1215
 1220 1225 1230

<210> 10
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

ES 2 661 569 T3

<400> 10

```

Thr  Ala  Pro  Leu  Asp  His  Lys  Asp  Lys  Gly  Leu  Gln  Ser  Leu  Thr  Leu
1      5      10      15
Asp  Gln  Ser  Val  Arg  Lys  Asn  Glu  Lys  Leu  Lys  Leu  Ala  Ala  Gln  Gly
20
Ala  Glu  Lys  Thr  Tyr  Gly  Asn  Gly  Asp  Ser  Leu  Asn  Thr  Gly  Lys  Leu
35      40      45
Lys  Asn
50

```

5 <210> 11
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 11

```

Thr  Ala  Pro  Leu  Asp  His  Lys  Asp  Lys  Ser  Leu  Gln  Ser  Leu  Thr  Leu
1      5      10      15
Asp  Gln  Ser  Val  Arg  Lys  Asn  Glu  Lys  Leu  Lys  Leu  Ala  Ala  Gln  Gly
20
Ala  Glu  Lys  Thr  Tyr  Gly  Asn  Gly  Asp  Ser  Leu  Asn  Thr  Gly  Lys  Leu
35      40      45
Lys  Asn
50

```

15 <210> 12
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

25 <400> 12

```

Thr  Ala  Pro  Leu  Asp  His  Lys  Asp  Lys  Gly  Leu  Lys  Ser  Leu  Thr  Leu
1      5      10      15
Glu  Asp  Ser  Ile  Ser  Gln  Asn  Gly  Thr  Leu  Thr  Leu  Ser  Ala  Gln  Gly
20
Ala  Glu  Arg  Thr  Phe  Lys  Ala  Gly  Asp  Lys  Asp  Asn  Ser  Leu  Asn  Thr
35      40      45
Gly  Lys  Leu  Lys  Asn
50

```

30 <210> 13
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 13

```

Thr  Ala  Pro  Leu  Asp  His  Lys  Asp  Lys  Gly  Leu  Lys  Ser  Leu  Thr  Leu
1      5      10      15
Glu  Asp  Ser  Ile  Ser  Gln  Asn  Gly  Thr  Leu  Thr  Leu  Ser  Ala  Gln  Gly
20
Ala  Glu  Lys  Thr  Tyr  Gly  Asn  Gly  Asp  Ser  Leu  Asn  Thr  Gly  Lys  Leu
35      40      45
Lys  Asn
50

```

40 <210> 14
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 14

5

```

Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu
 1      5      10      15
Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly
 20      25      30
Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr
 35      40      45
Gly Lys Leu Lys Asn
 50

```

<210> 15

<211> 174

10

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 15

```

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

Arg Ile Ser Ala Gly Tyr Arg Ile Asn Asp Leu Arg Phe Ala Val Asp
 50      55      60
Tyr Thr Arg Tyr Lys Asn Tyr Lys Ala Pro Ser Thr Asp Phe Lys Leu
 65      70      75
Tyr Ser Ile Gly Ala Ser Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Thr Gln Ser Pro
 80      85      90
Val Lys Pro Tyr Leu Gly Ala Arg Leu Ser Leu Asn Arg Ala Ser Val
 95      100      105
Asp Leu Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Gln Thr Ser Ile Gly Leu Gly
 110      115      120
Val Leu Thr Gly Val Ser Tyr Ala Val Thr Pro Asn Val Asp Leu Asp
 125      130      135
Ala Gly Tyr Arg Tyr Asn Tyr Ile Gly Lys Val Asn Thr Val Lys Asn
 140      145      150      155      160
Val Arg Ser Gly Glu Leu Ser Val Gly Val Arg Val Lys Phe
 165      170

```

15

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 16

25

```

Met Asn Arg Thr Ala Phe Cys Cys Leu Ser Leu Thr Thr Ala Leu Ile
 1      5      10      15
Leu Thr Ala

```

<210> 17

30

<211> 66

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Polipéptido sintético

<400> 17

ES 2 661 569 T3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
 20 25 30
 Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 35 40 45
 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 50 55 60
 Lys Val
 65

5 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 18

15 Phe Leu Leu Ala Val
 1 5
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 19

25 Gly ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 20
 Gly Gly Gly ser
 1

40 <210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 21

Gly Gly Ser Gly
 1

50 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

	<223> Polipéptido sintético	
	<400> 22	
5		Gly Gly Ser Gly Gly 1 5
10	<210> 23 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Polipéptido sintético	
	<400> 23	
		Gly Ser Gly Ser Gly 1 5
20	<210> 24 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Polipéptido sintético	
	<400> 24	
30		Gly Ser Gly Gly Gly 1 5
35	<210> 25 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Polipéptido sintético	
	<400> 25	
		Gly Gly Gly Ser Gly 1 5
45	<210> 26 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Polipéptido sintético	
	<400> 26	
		Gly Ser Ser Ser Gly 1 5
55	<210> 27 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

<223> Polipéptido sintético

<400> 27

5

Gly Glu His Thr
1

<210> 28

<211> 66

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 28

Val	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro
1				5					10					15	
Leu	Asp	His	Lys	Asp	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser
			20					25					30		
Val	Arg	Lys	Asn	Glu	Lys	Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys
		35					40					45			
Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp	Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Asn	Asp
	50					55					60				
Lys	Val														
65															

<210> 29

<211> 66

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido sintético

25

<400> 29

Val	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly	Ala	Arg	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro
1				5					10					15	
Leu	Asp	His	Lys	Asp	Lys	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser
			20					25					30		
Val	Arg	Lys	Asn	Glu	Lys	Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys
		35					40					45			
Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp	Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Asn	Asp
	50					55					60				
Lys	Val														
65															

30

<210> 30

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 30

40

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

<210> 31

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

ES 2 661 569 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 31

5

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende una proteína de unión al factor H (fHbp) no natural derivada de fHbp ID1 (que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1) y que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 % con SEQ ID NO: 1, en la que la fHbp no natural tiene una sustitución de aminoácido en la posición R41, y en la que dicha fHbp no natural tiene una afinidad inferior por el factor H humano (fH) que la fHbp ID1, y genera anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis*;
 en la que la sustitución de aminoácido en R41 es R41S o R41A; o
 en la que la composición comprende un adyuvante seleccionado de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, MF59™, una emulsión de aceite en agua, monofosforil lípido A o una saponina; o
 en la que la composición comprende vesículas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* modificadas genéticamente para expresar la fHbp; o
 en la que la composición comprende microvesículas de *Neisseria meningitidis* modificadas genéticamente para expresar la fHbp.
2. Una proteína de unión al factor H (fHbp) no natural derivada de fHbp ID1 (que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1) y que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 % con SEQ ID NO: 1, en donde la fHbp no natural tiene una sustitución de aminoácido en la posición R41, siendo la sustitución R41S o R41A; y en donde dicha fHbp no natural tiene una afinidad inferior por el factor H humano (fH) que la fHbp ID1, y genera anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis*.
3. La composición de la reivindicación 1 o la fHbp de la reivindicación 2, en la que la secuencia de aminoácidos no natural difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en 1 a 10 aminoácidos.
4. La composición o la fHbp de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la secuencia de aminoácidos no natural comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
5. La composición o la fHbp de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la fHbp no natural se une al fH humano con afinidad que no es superior al aproximadamente 60 % de la afinidad de la fHbp ID1 por el fH humano.
6. La composición o la fHbp de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la sustitución de aminoácido en R41 es R41S.
7. La composición o la fHbp de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la sustitución de aminoácido en R41 es R41A.
8. La composición o la fHbp de las reivindicaciones 6 o 7, en la que la fHbp no natural comprende un segmento A variable (V_A) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.
9. La composición o la fHbp de cualquier reivindicación anterior, en la que la fHbp no natural comprende una identidad de secuencia de al menos el 95 % con SEQ ID NO: 1.
10. La composición o la fHbp de la reivindicación 9, en la que la fHbp no natural comprende una identidad de secuencia de al menos el 98 % con SEQ ID NO: 1.
11. La composición de la reivindicación 1 o la fHbp de la reivindicación 2, en la que la fHbp no natural comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 distinta de la sustitución de aminoácido en R41.
12. La composición de las reivindicaciones 1 o 3 a 11, en donde la composición comprende un adyuvante seleccionado de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, MF59™, una emulsión de aceite en agua, monofosforil lípido A o una saponina.
13. La composición de las reivindicaciones 1 o 3 a 11, en donde la composición comprende vesículas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* modificadas genéticamente para expresar la fHbp.
14. La composición de las reivindicaciones 1 o 3 a 11, en donde la composición comprende microvesículas de *Neisseria meningitidis* modificadas genéticamente para expresar la fHbp.
15. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 14 para su uso en un método de generación de una respuesta de anticuerpos en un mamífero, siendo dicho mamífero un ser humano.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicha respuesta de anticuerpos comprende la producción de anticuerpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis*.

17. Un ácido nucleico que codifica una fHbp no natural de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 11, o que codifica una fHbp no natural de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.
- 5 18. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 17.
19. Una célula hospedadora modificada genéticamente que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 17 o el vector de expresión recombinante de la reivindicación 18.
- 10 20. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 11, o una fHbp de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11 para su uso en un método de prevención de la enfermedad producida por *Neisseria*.

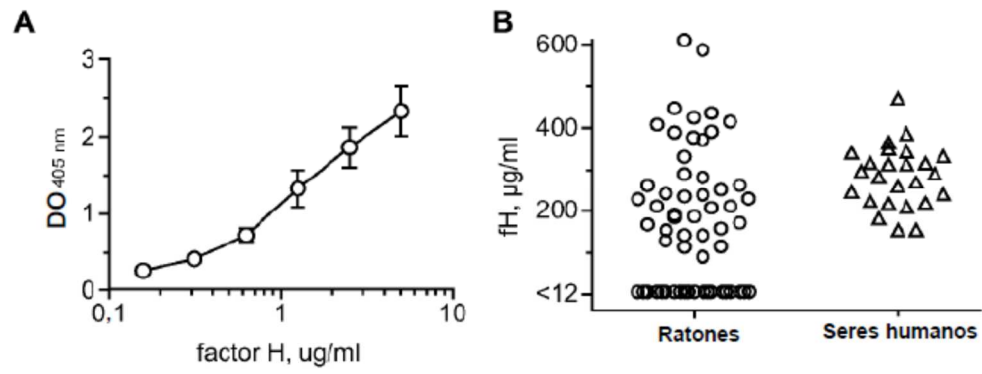


FIG. 1

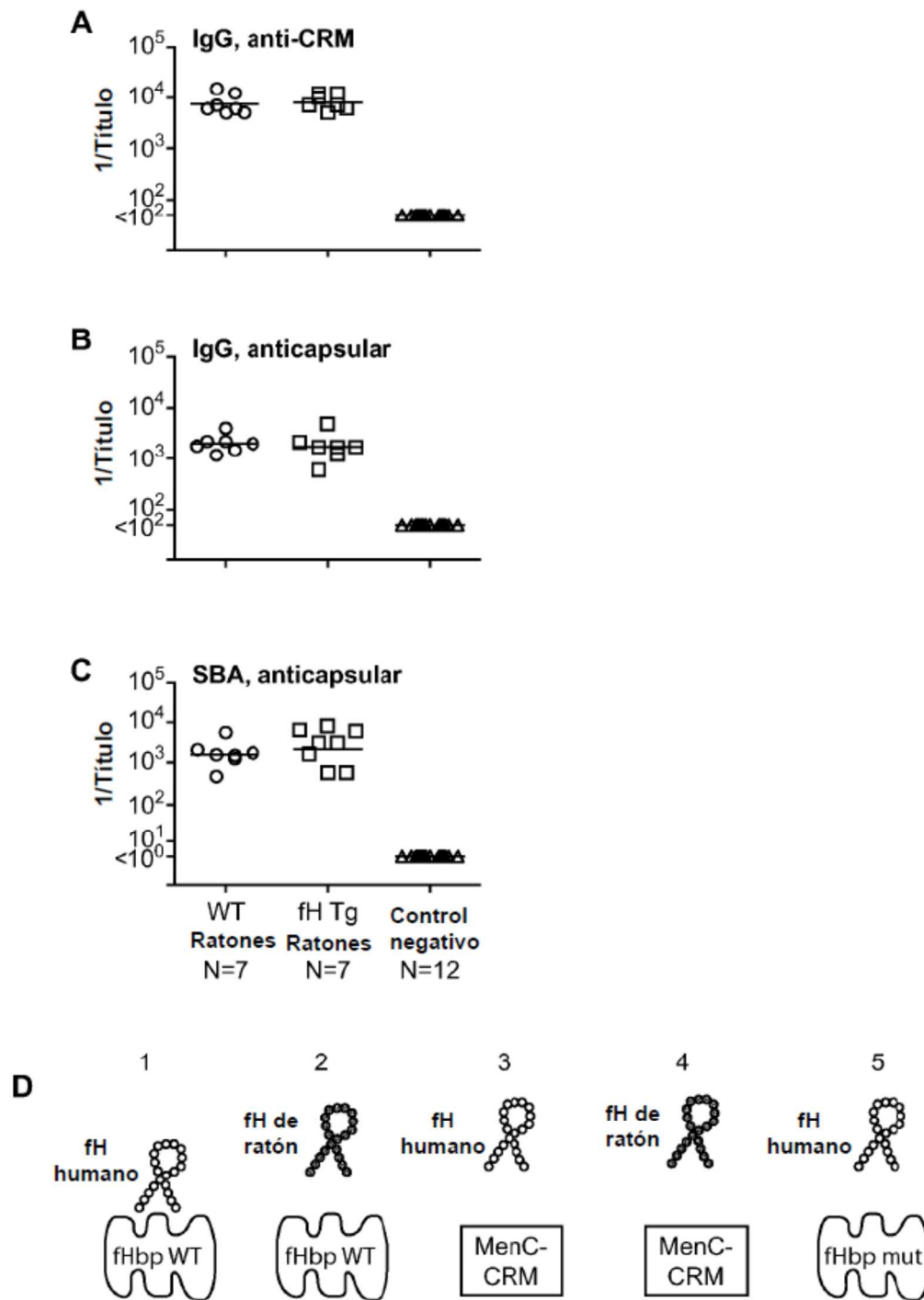


FIG. 2

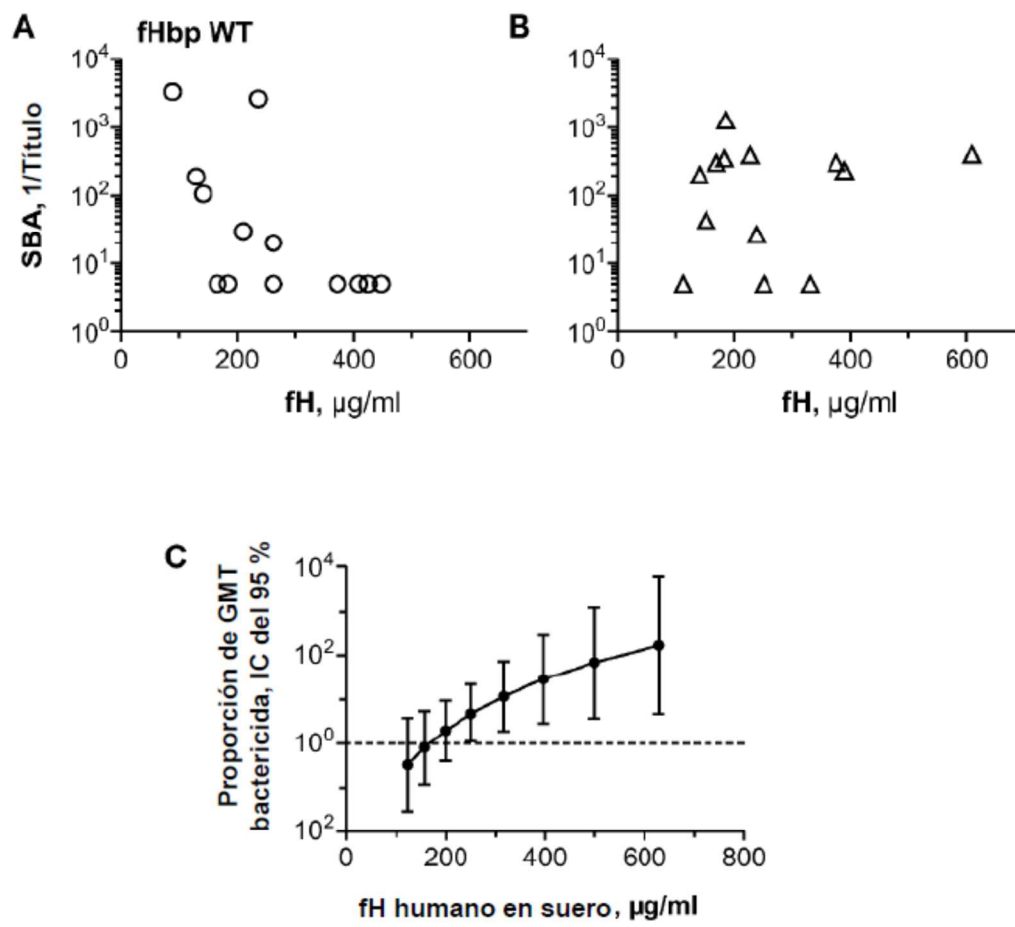


FIG. 3

Unión de fH, JAR4 y JAR5 a fHbp ID 1 de tipo silvestre y mutantes

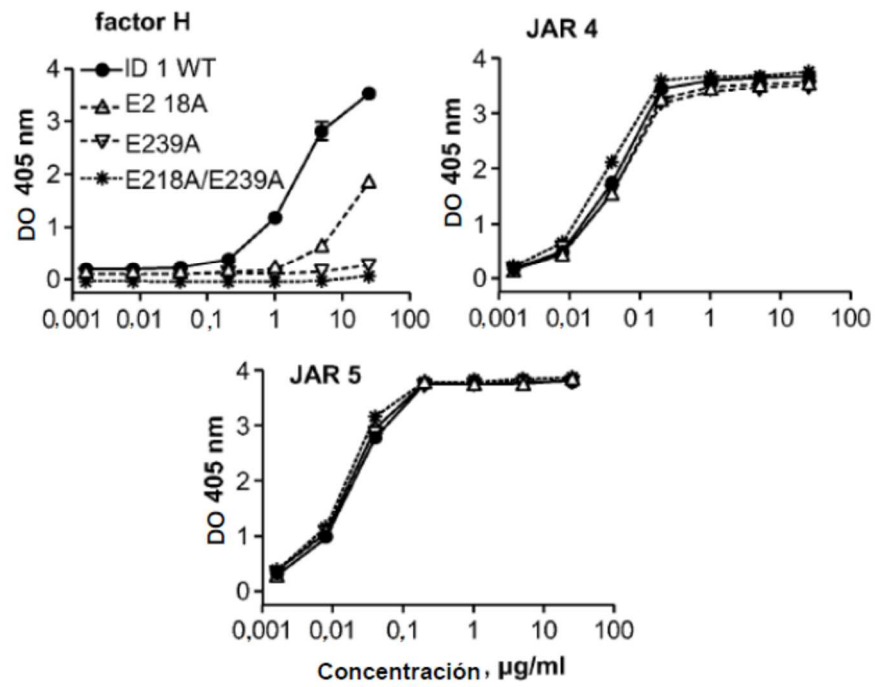


FIG. 4

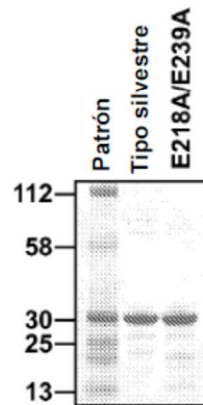


FIG. 5

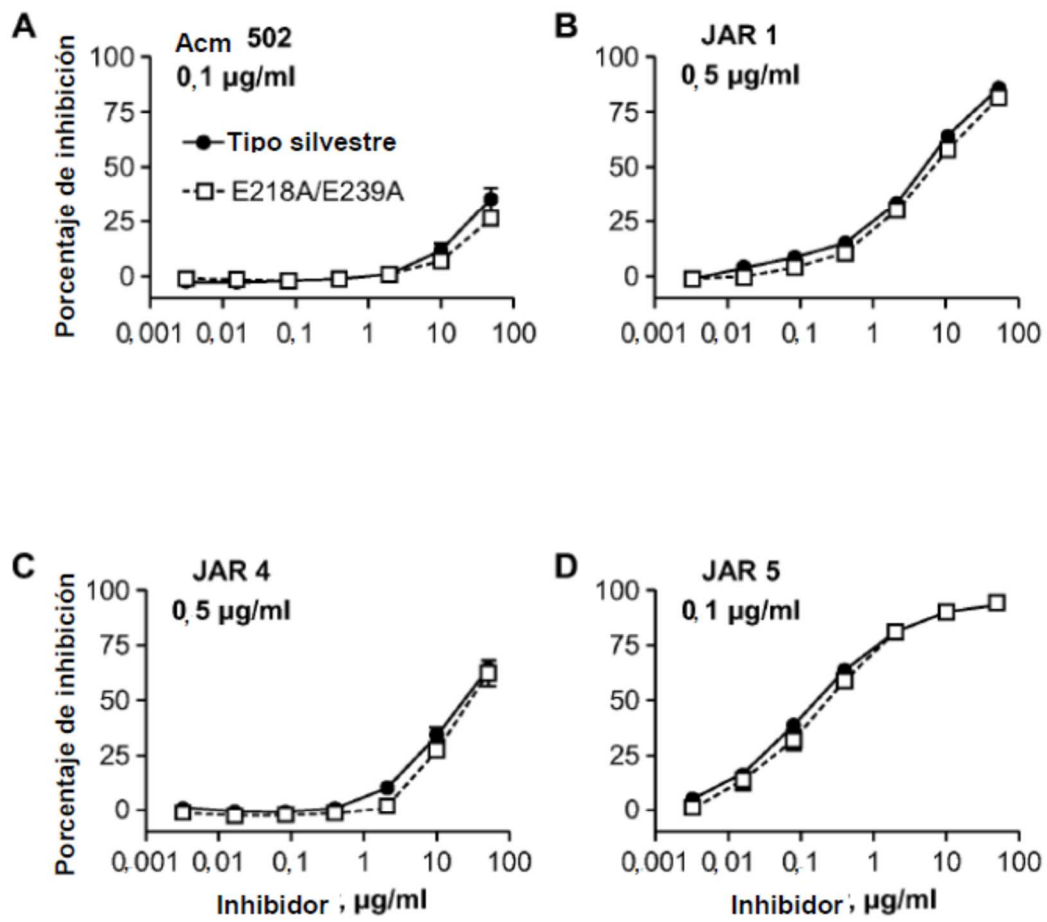


FIG. 6

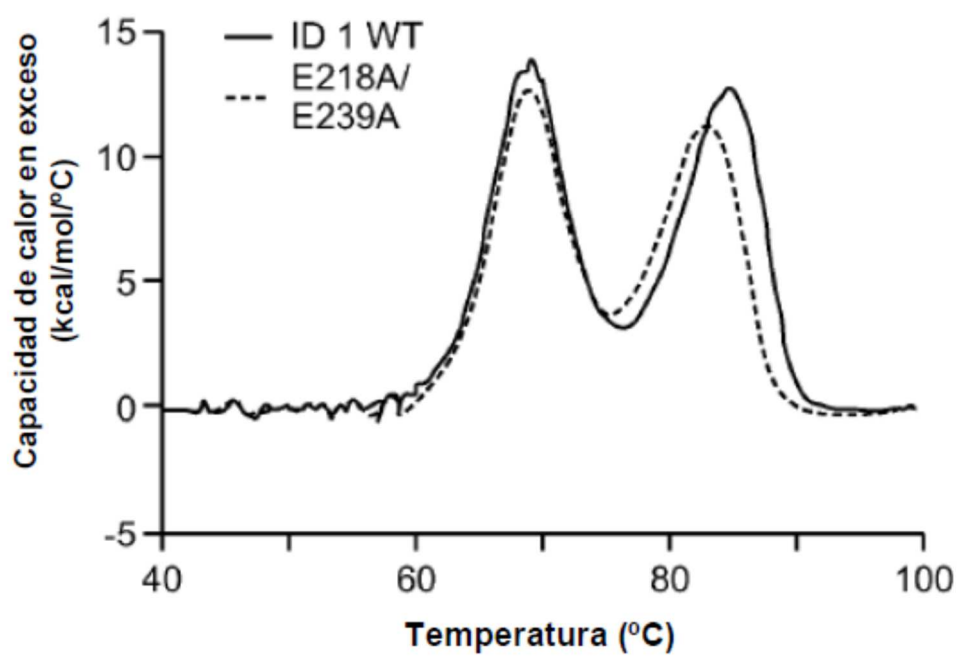


FIG. 7A

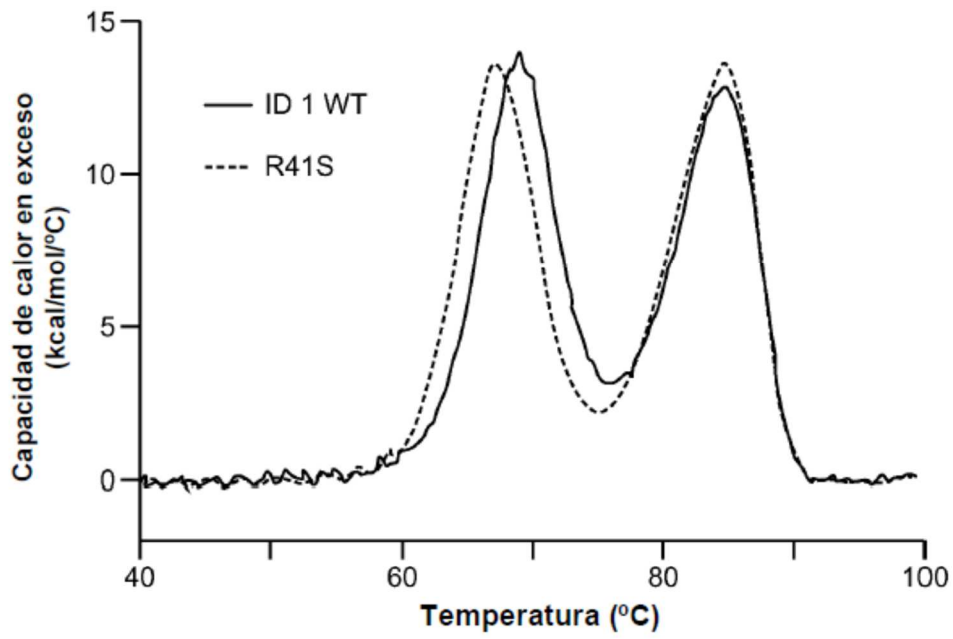


FIG. 7B

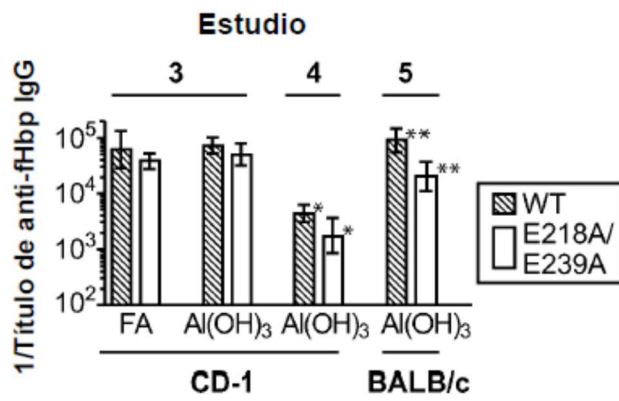


FIG. 7C

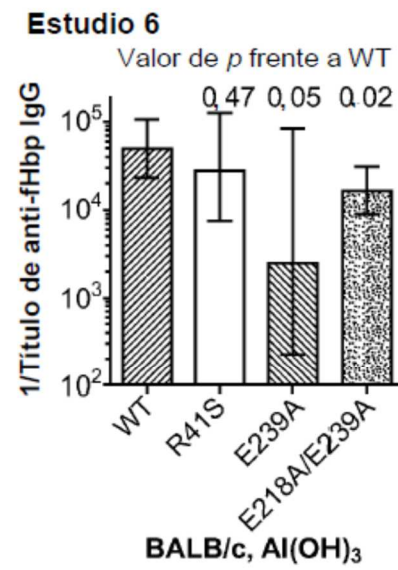


FIG. 7D

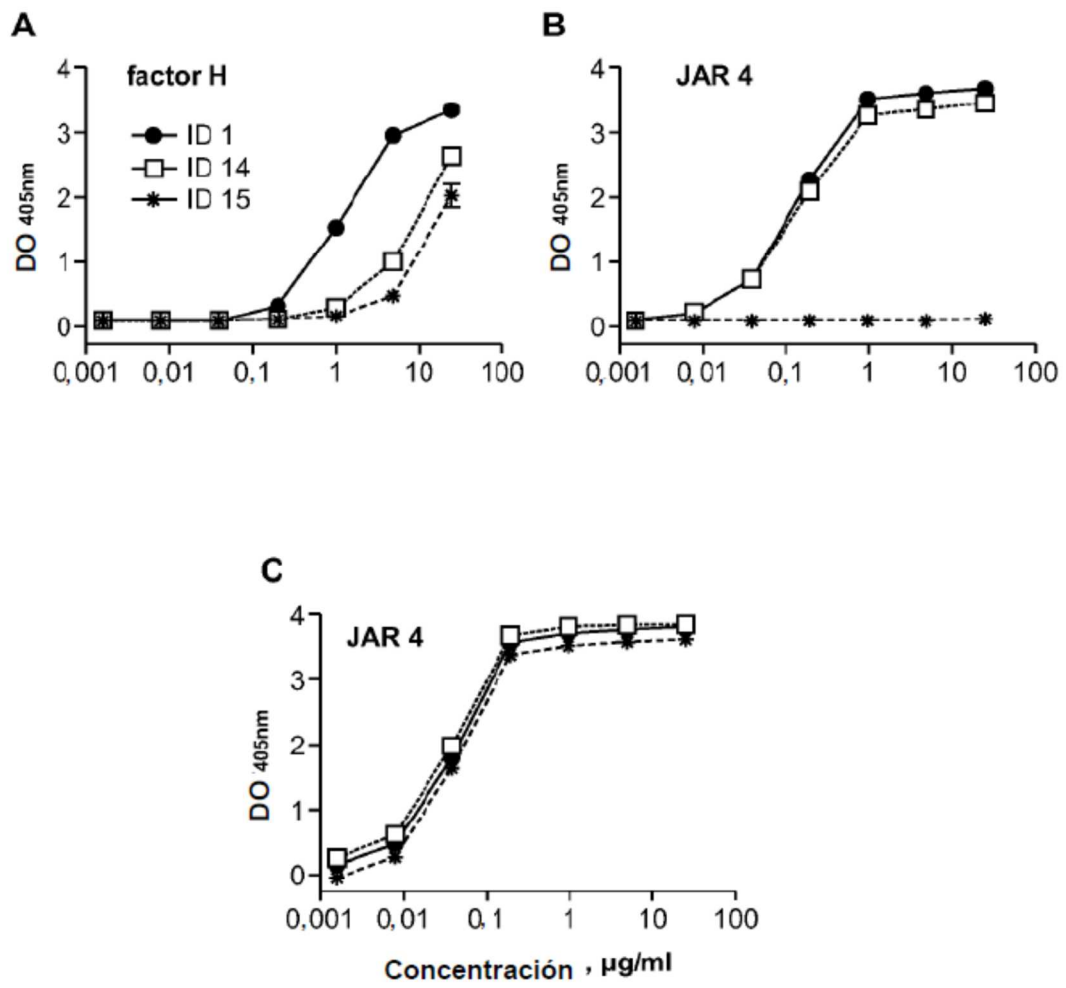


FIG. 8

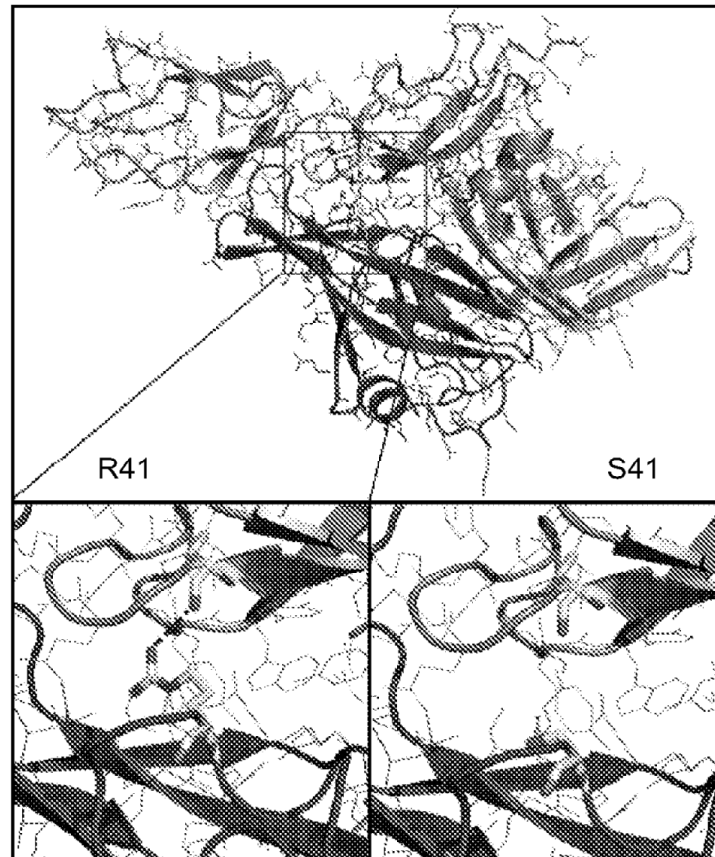


FIG. 9A

```

MRLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLG 60
NVIMVCRKGEWVALNPLRKCKQKRPCGHPGDTFPGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQL 120
LGEINYRECOTDGTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCNS 180
GYKIEGDEEMHCSDDGFSKEKPKCWEISCKSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMG 240
YEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYF 300
ATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYYCDEH 360
FETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGKSIDVACHPGY 420
ALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSKSSIDIENGFISESQYTYALKEKAKYQCKLG 480
YVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYCHDGY 540
ESNTGSTTGSIVCGYNGWSOLPICYERECELPKIDVHLVPDRKKDQYKVGEVLKFSCKPG 600
FTIVGPNSVQCYHFGLSPLDLPICKEQVQSCGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYYCN 660
PRFLMKGPNKIQCVDGWTTLPVCIVEESTCGDIPELEHGWAQLSSPPYYYGDSVEFNCS 720
ESFTMIGHRSITCIHGVWTQLPQCVAIDKLKKCKSSNLIILEEHLKNKKEFDHNSNIRYR 780
CRGKEGWIHTVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNRYRDGEKVSVLCQ 840
ENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLSYT 900
CEGGFRRISEENETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEEVITYKCF 960
EGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIIPMGEKKDVYKAGEQVITYTCAT 1020
YYKMDGASNVTICINSRWTGRPTCRDTSCVNPPTVQNAIYIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSP 1080
YEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIIDNGDITSEPLSVYAPASSVEYQCQN 1140
LYQLEGNKRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRTGESVEFV 1200
CKRGYRLSSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKR 1231 (SEQ ID NO:9)

```

FIG. 9B

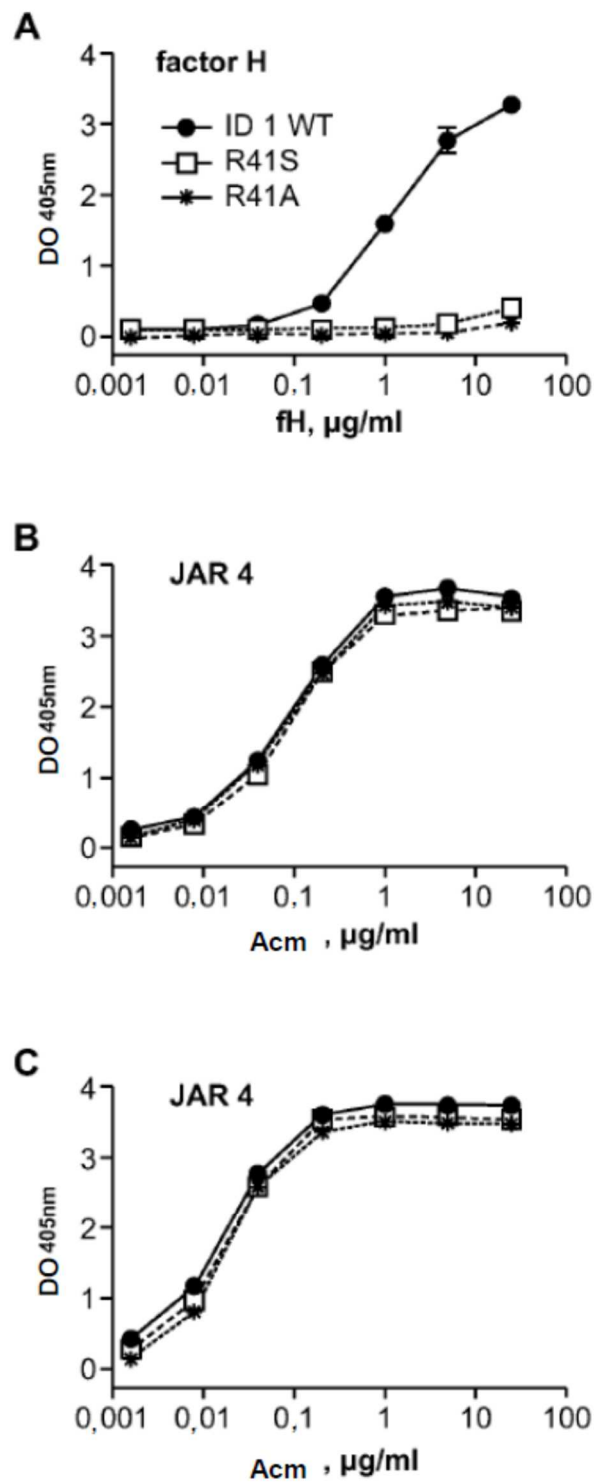


FIG. 10

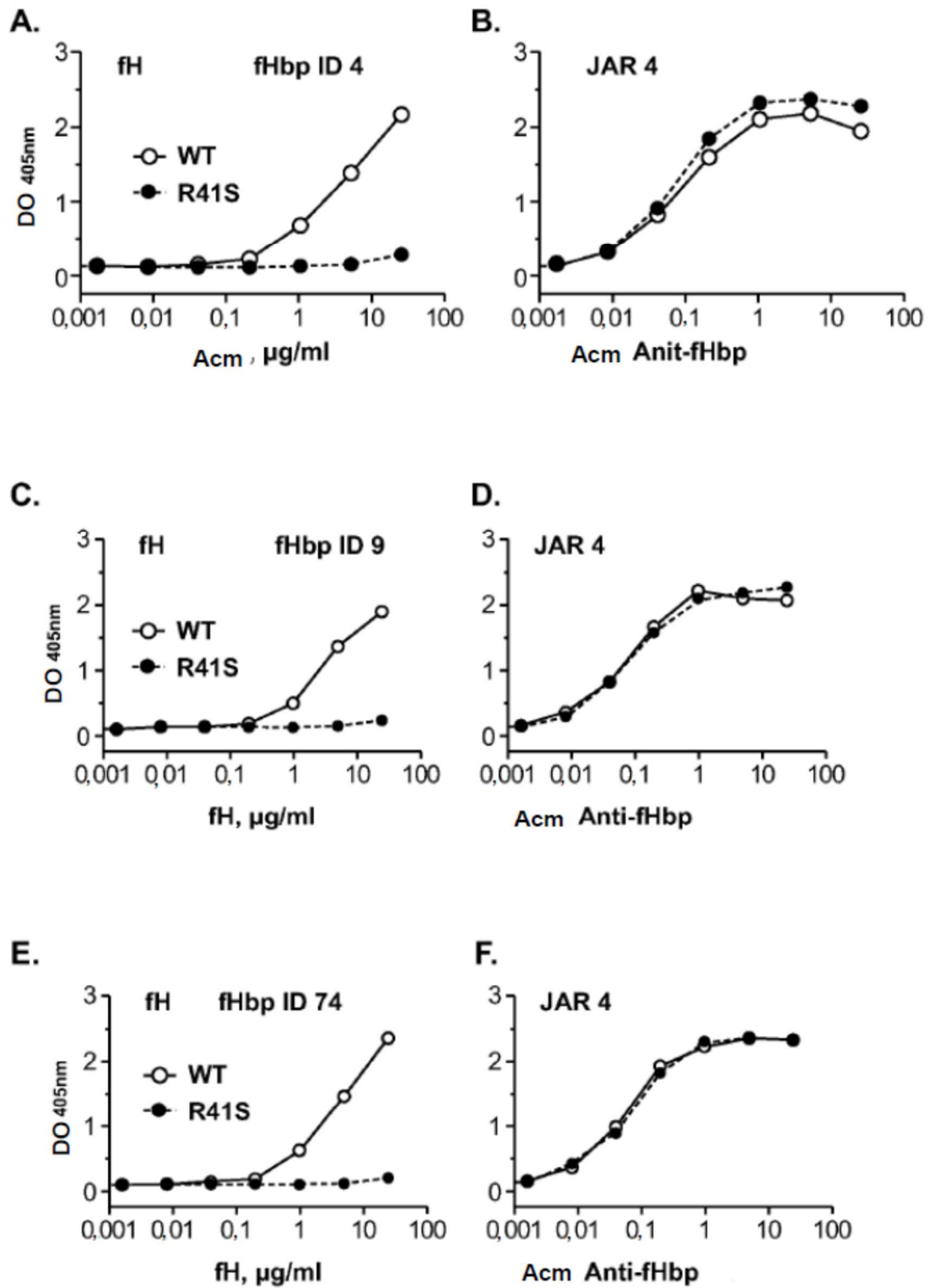


FIG. 11

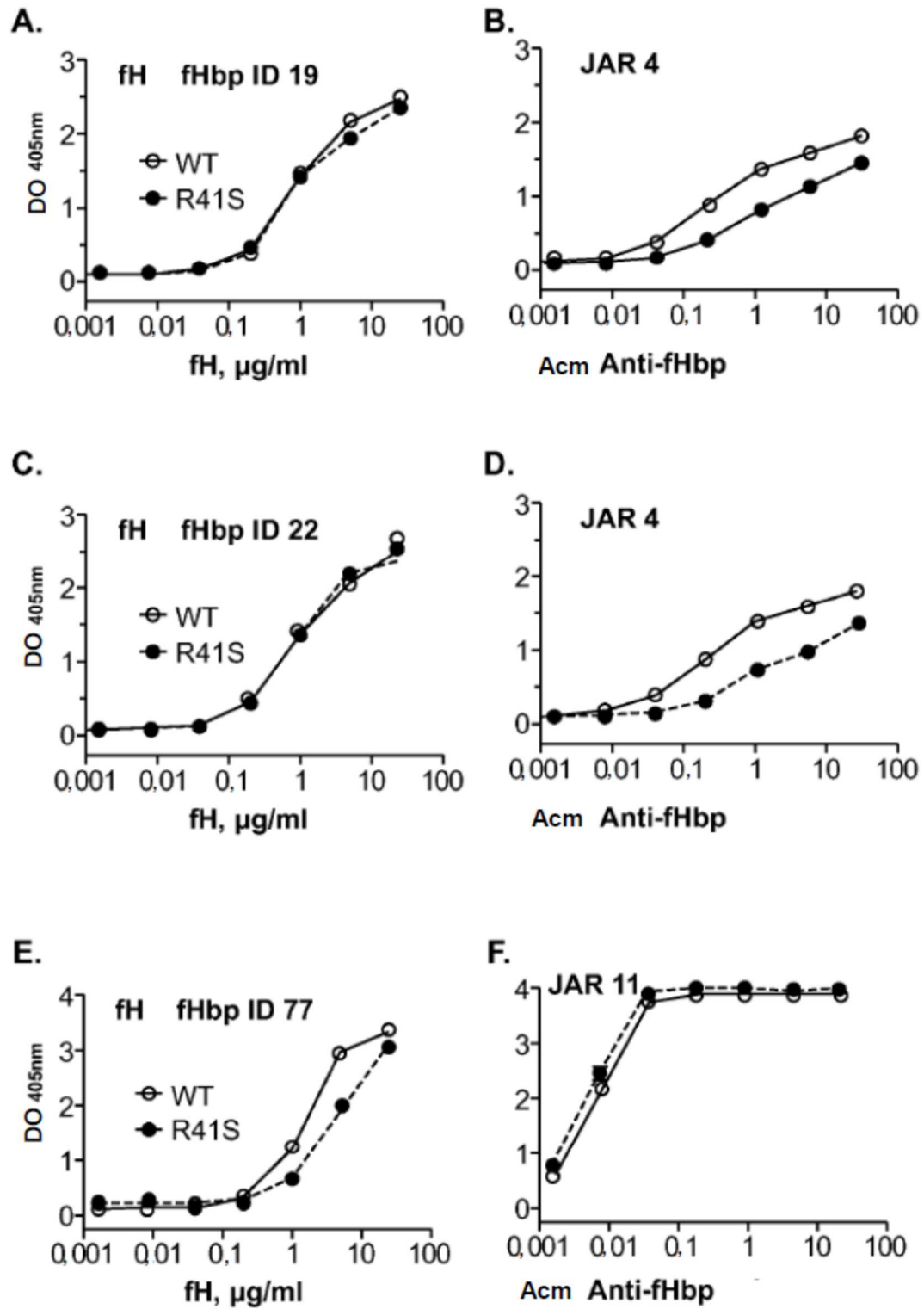


FIG. 12

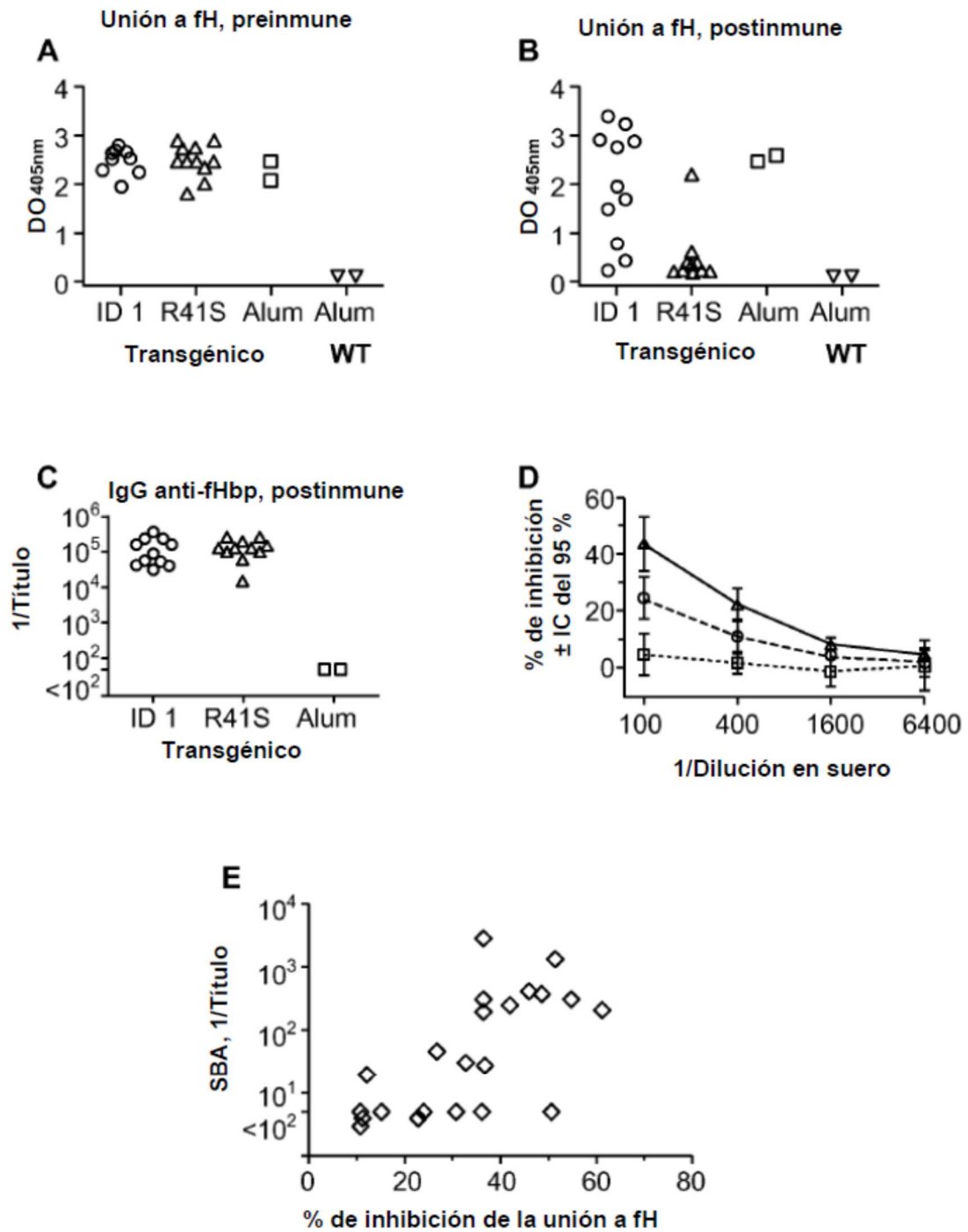
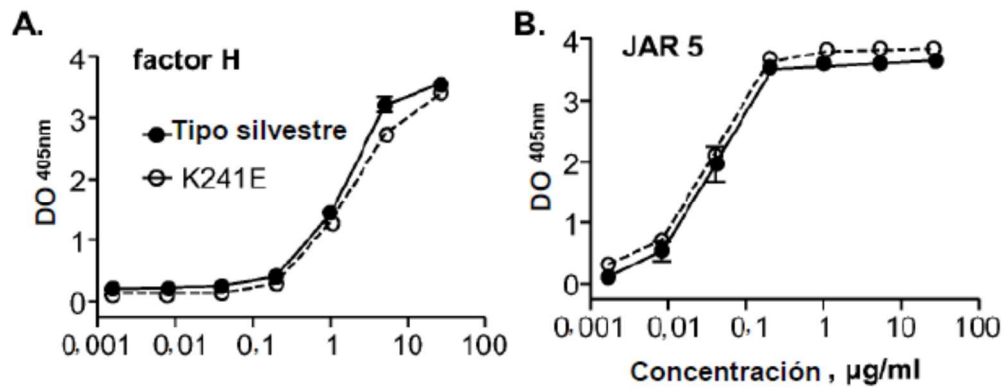


FIG. 13

Unión de fH y JAR5 a fHbp ID 1 de tipo silvestre y mutante



Unión de fH y JAR5 a fHbp ID 15 de tipo silvestre y mutante

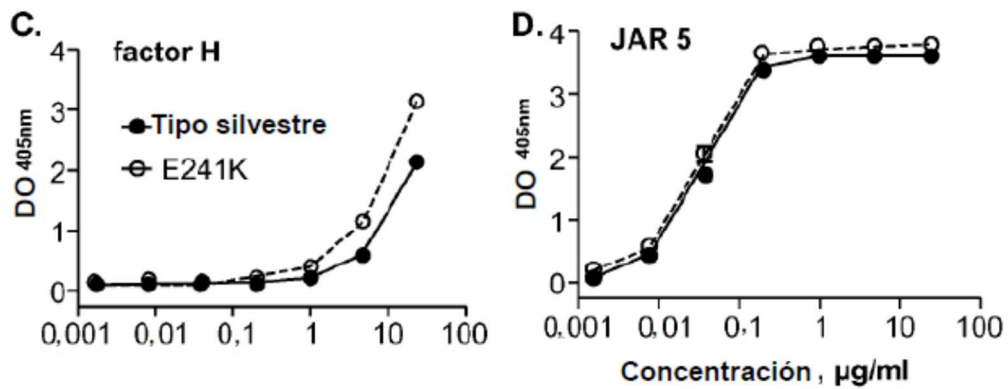


FIG. 14

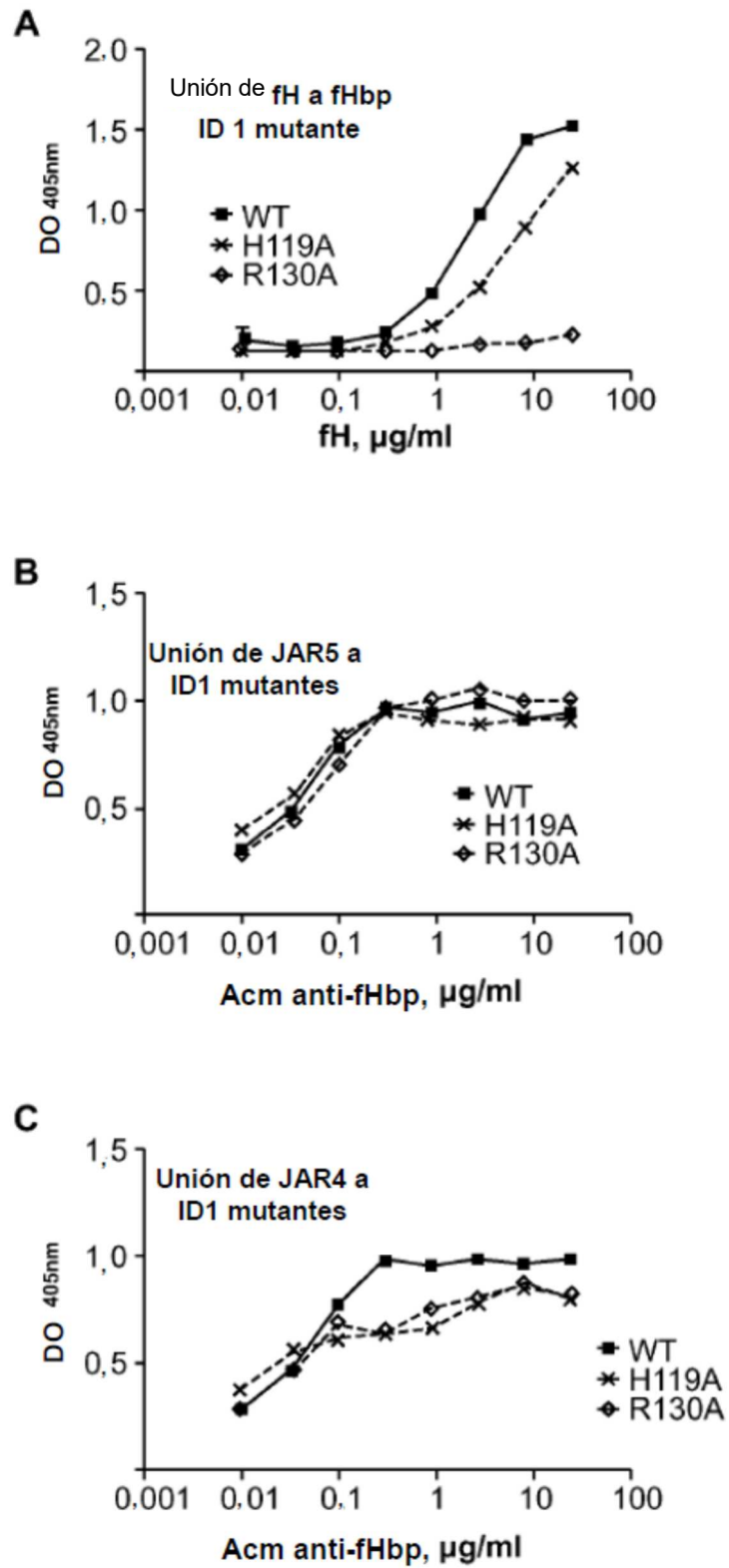


FIG. 15

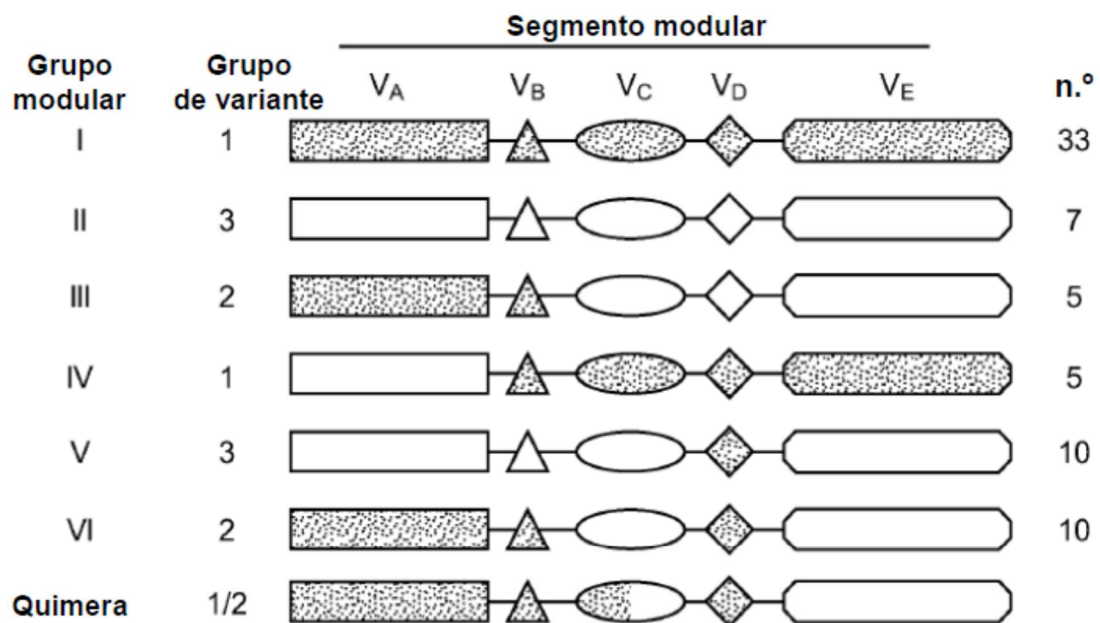


FIG. 16

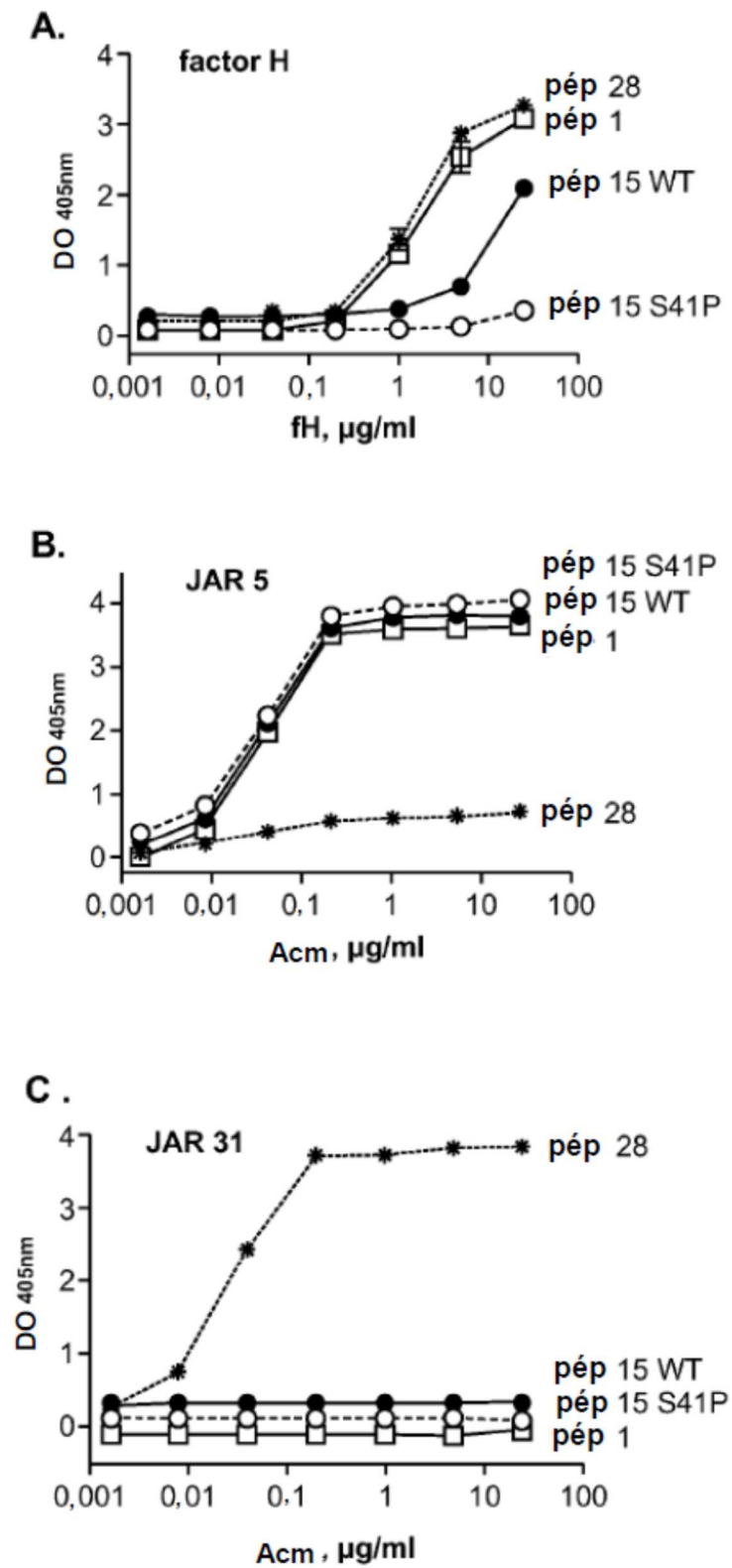


FIG. 17

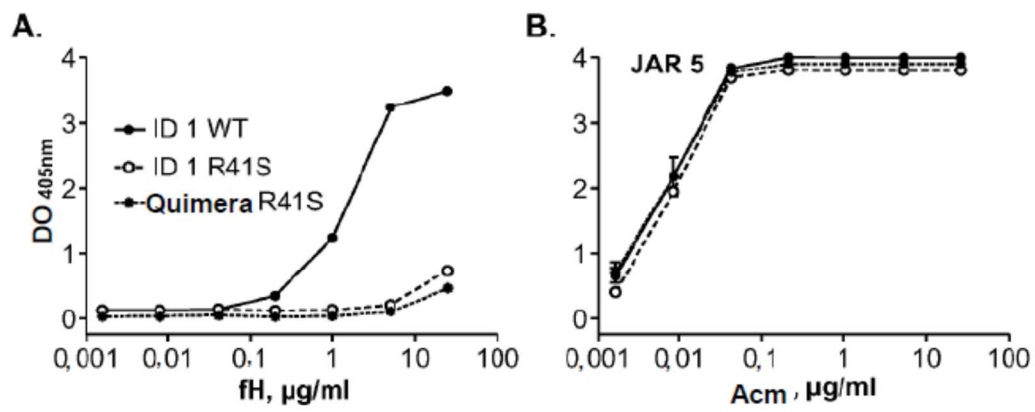


FIG. 18

A.

ID15	CSSGGGGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISONGTILTLAQGAER	55
ID1	CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEK	
Quimera	CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEK	
ID77	CSSGGGG-----VAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEK	
ID28	CSSGGGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPONGTILTLAQGAEK	
ID22	CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEK	
ID15	TFKAGDKNSLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTE	112
ID1	TYGNGD---SLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTE	
Quimera	TYGNGD---SLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTE	
ID77	TYGNGD---SLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQIE	
ID28	TFKAGDKNSLNTGKLKNDKISRFDFFVQKIEVDGQTITLASGEFQVYKQSHSALTALQIE	
ID22	TYGNGD---SLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQIE	
ID15	QVQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIVGEHTSFGLPKPMATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF	172
ID1	QIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFGLPKPEGGRAHYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF	
Quimera	QIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDF	
ID77	KINNPDKIDSLINQSRFLVSGLGGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDF	
ID28	KINNPDKTDSLINQSRFLVSGLGGEHTAFNQLP-GGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDF	
ID22	KINNPDKIDSLINQSRFLVSGLGGEHTAFNQLP-SGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDF	
ID15	AAKQGHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQ	232
ID1	AAKQNGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQ	
Quimera	AAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQ	
ID77	AAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQ	
ID28	TKKQGYGRIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQ	
ID22	TKKQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYHLALFGDRAQ	
ID15	EVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ 263 (SEQ ID NO:5)	
ID1	EVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ 255 (SEQ ID NO:1)	
Quimera	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 254 (SEQ ID NO:8)	
ID77	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 254 (SEQ ID NO:4)	
ID28	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 262 (SEQ ID NO:3)	
ID22	EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ 254 (SEQ ID NO:2)	

FIG. 19

B.
(A1.2)
ID 1 VAADIGAGLA DALTAPLDHK DKGLQSLTLD QSVRKNEKLK LAAQGAEKTY GNGD---SLN TGKLNNDKV (SEQ ID NO:28)
ID 77 VAADIGARLA DALTAPLDHK DKSLQSLTLD QSVRKNEKLK LAAQGAEKTY GNGD---SLN TGKLNNDKV (SEQ ID NO:29)
(A1.5)

C.
ID 1 (C1.5) VYKQSHSALT AFQTEQIQDS EHSKGMVAKR QFRIGDIAGE HTSF**DKLPEG** GRATYRGTA**F** (SEQ ID NO:30)
ID 77 (C2.4) VYKQSHSALT ALQTEQ**VQDS** EHSKGMVAKR QFRIGDI**VQSE** HTSFGKL**PKD** VMATYRGTA**F** (SEQ ID NO:31)

D.				41			
ID	MG	VG					
1	I	1	TAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGD---	SLNTGKLKN	SEQ	ID NO:10	
4	I	1	TAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGD---	SLNTGKLKN	SEQ	ID NO:11	
9	I	1	TAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGD---	SLNTGKLKN	SEQ	ID NO:10	
74	I	1	TAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGD---	SLNTGKLKN	SEQ	ID NO:10	
15	IV	1	TAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTTLTSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKN	SEQ	ID NO:12		
55	IV	1	TAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTTLTSAQGAEKTYGNGD---	SLNTGKLKN	SEQ	ID NO:13	
22	III	2	TAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGD---	SLNTGKLKN	SEQ	ID NO:11	
19	VI	2	TAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGD---	SLNTGKLKN	SEQ	ID NO:11	
77	VI	2	TAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGD---	SLNTGKLKN	SEQ	ID NO:11	
28	II	3	TAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKN	SEQ	ID NO:14		

FIG. 19 (Cont.1)

E.

ID 1 (v.1)	CSSGGGGG---	--VAADIGAG	LADALTAPLD	HKDKGLQSLT	LDQSVRKNEK	LKLAQAQAEK	55
ID 77 (v.2)	CSSGGGGG---	--VAADIGAG	LADALTAPLD	HKDKGLQSLT	LDQSVRKNEK	LKLAQAQAEK	55
Quimera 1	CSSGGGGG---	--VAADIGAG	LADALTAPLD	HKDKGLQSLT	LDQSVRKNEK	LKLAQAQAEK	55
ID 1	TYGNGD---	S	LNTGKLKNDK	VSRDFIRQI	EVDGQLITLE	SGEFQVYKQS	HSALTAFQTE 112
ID 77	TYGNGD---	S	LNTGKLKNDK	VSRDFIRQI	EVDGQLITLE	SGEFQVYKQS	HSALTAFQTE 112
Quimera	TYGNGD---	S	LNTGKLKNDK	VSRDFIRQI	EVDGQLITLE	SGEFQVYKQS	HSALTAFQTE 112
ID 1	QIQDSEHSGK	MVAKRQFRIG	DIA	GEHT	SFD	KLPEGGGRATY	RGTAFGSDDA GGKLTYYTIDF 172
ID 77	KINNEPKIDS	LINQSFVLS	GIG	GEHT	AFN	QLP-DGKAEY	HGKAFSSDDA GGKLTYYTIDF 171
Quimera	QIQDSEHSGK	MVAKRQFRIG	DIA	GEHT	AFN	QLP-DGKAEY	HGKAFSSDDA GGKLTYYTIDF 171
ID 1	AAKQGNKGIE	HLKSPELNVD	LAAADIKPDG	KRHAVISGSV	LYNQAEKGSY	SLGIFGGKAQ	232
ID 77	AAKQGHGKIE	HLKTPEQNVE	LAAAEKKADE	KSHAVILGDT	RYGSEEKGTY	HLALFGDRAQ	231
Quimera	AAKQGHGKIE	HLKTPEQNVE	LAAAEKKADE	KSHAVILGDT	RYGSEEKGTY	HLALFGDRAQ	231
ID 1	EVAGSAEVKT	VNGIRHIGLA	AKQ	255	(SEQ ID NO:1)		
ID 77	EIAGSATVKI	GEKVHEIGIA	GKQ	254	(SEQ ID NO:4)		
Quimera	EIAGSATVKI	GEKVHEIGIA	GKQ	254	(SEQ ID NO:8)		

FIG. 19 (Cont.2)

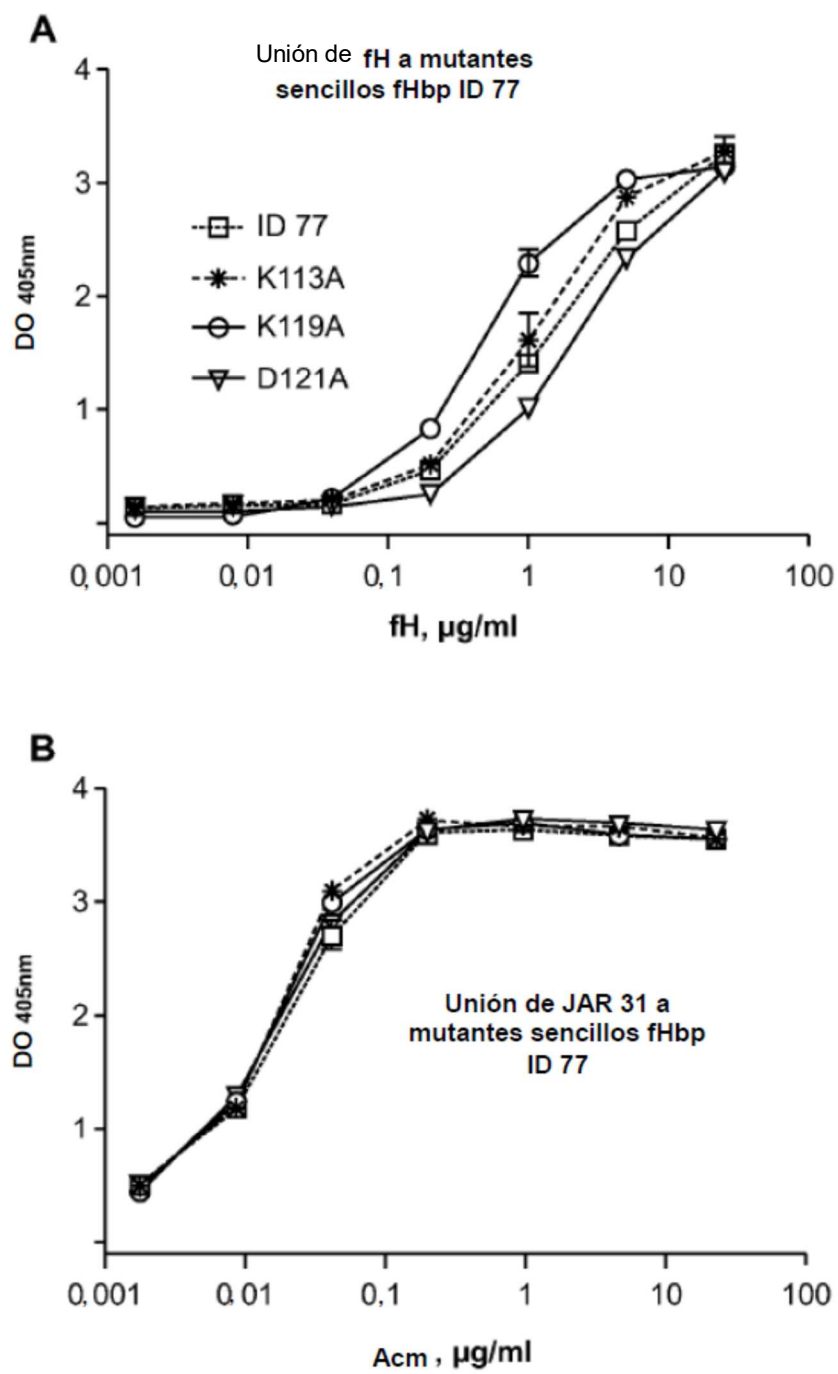


FIG. 20

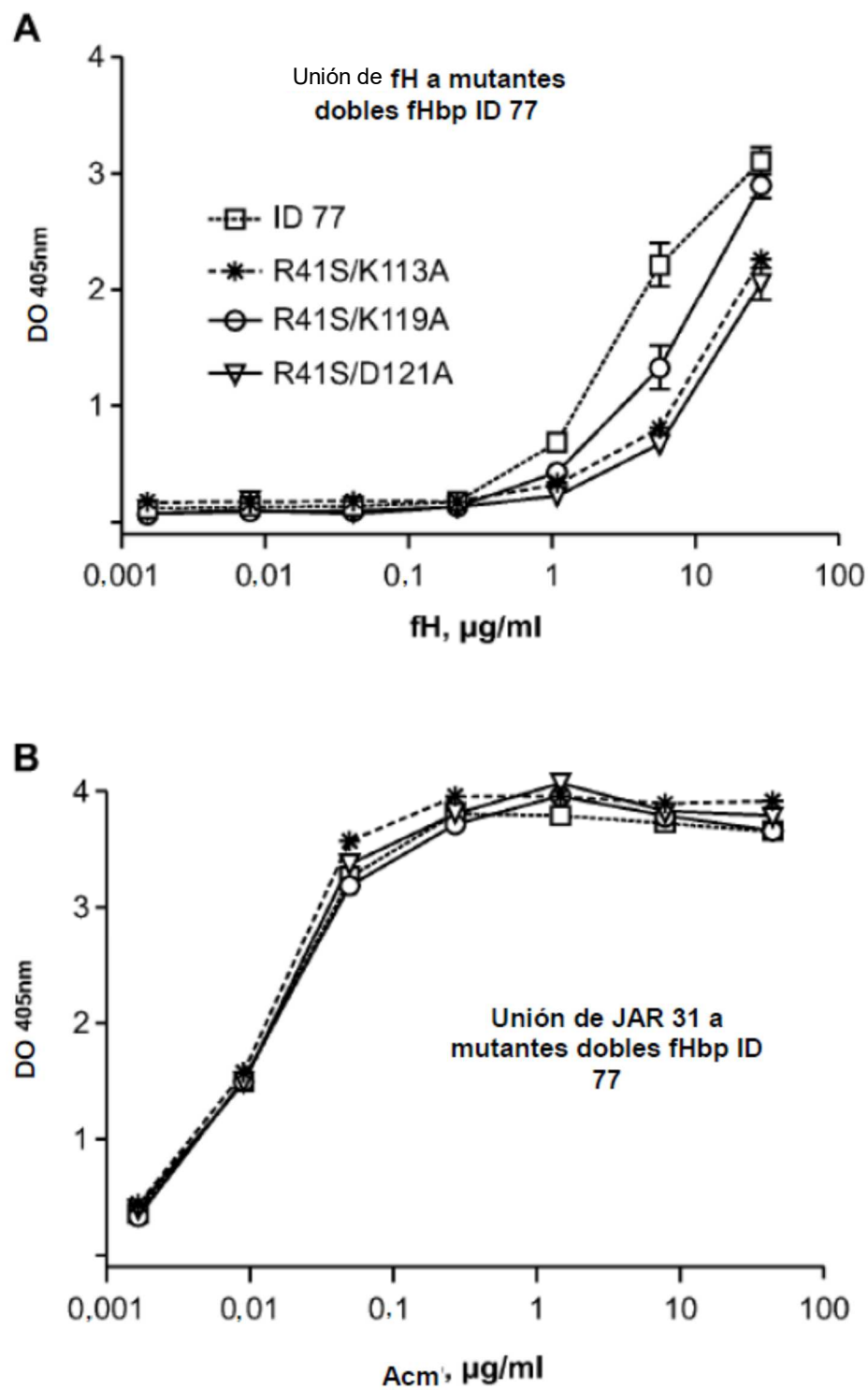


FIG. 21

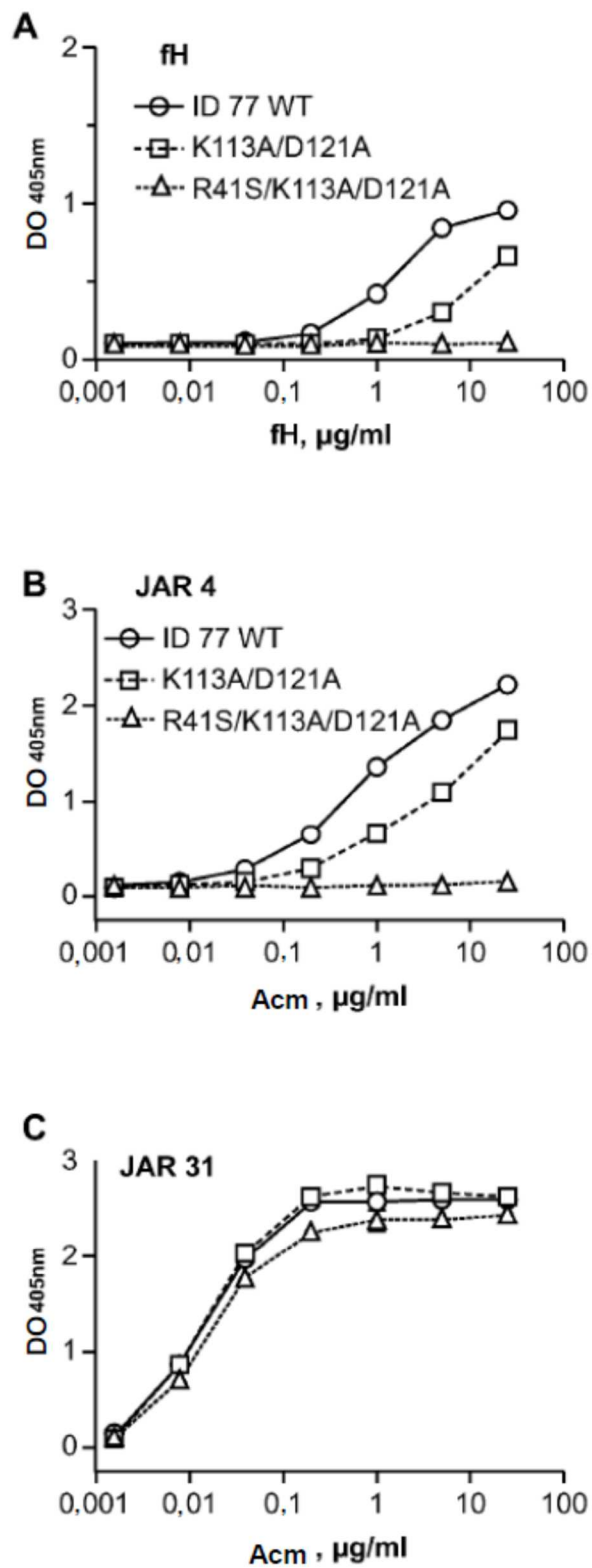


FIG. 22

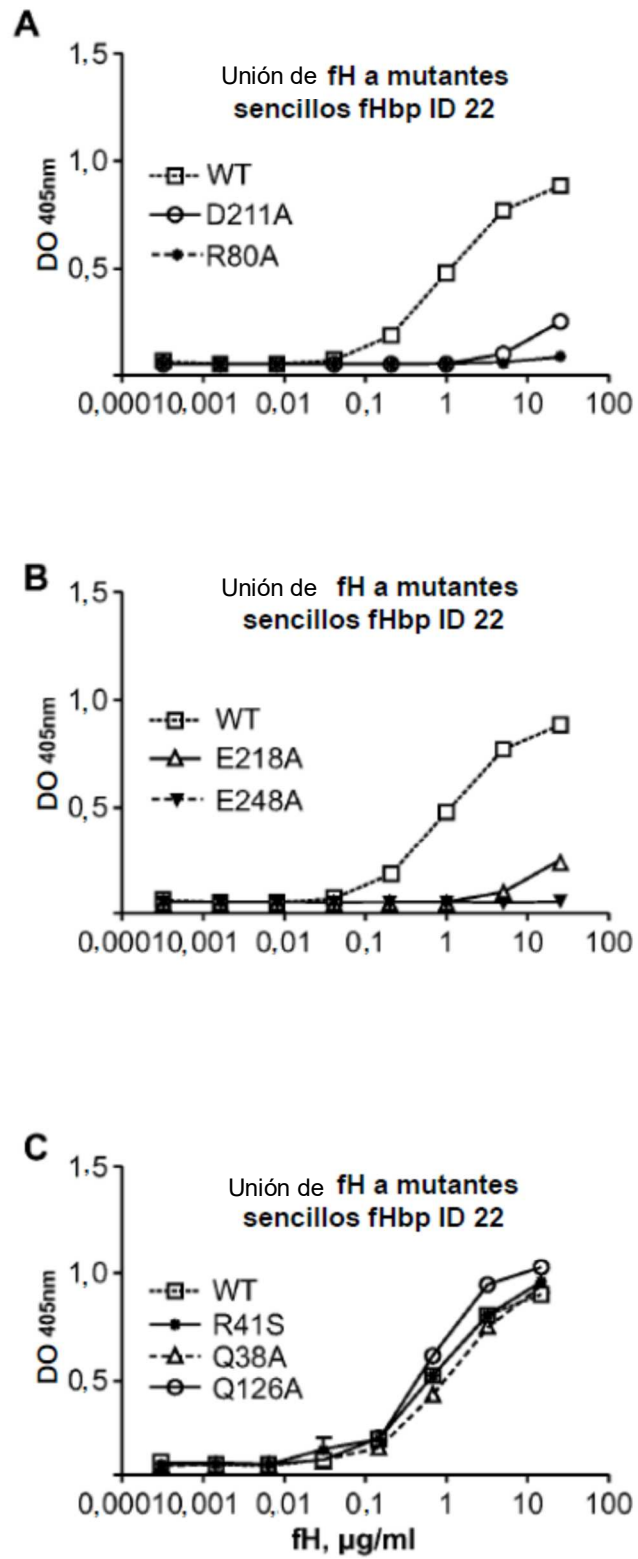
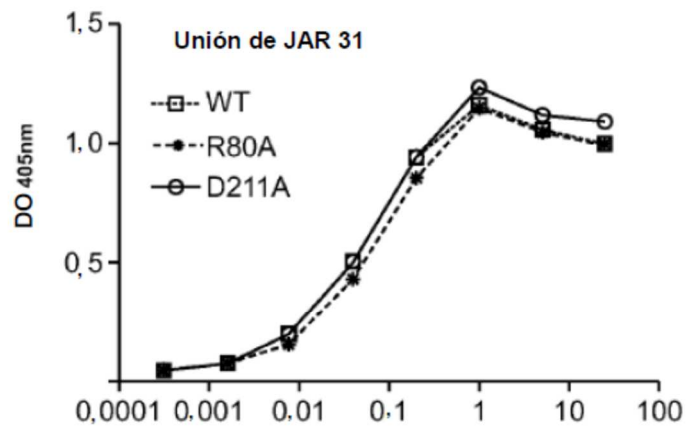


FIG. 23

Unión de JAR 31 a fHbp ID 22 de tipo silvestre y mutantes

Panel A



Panel B

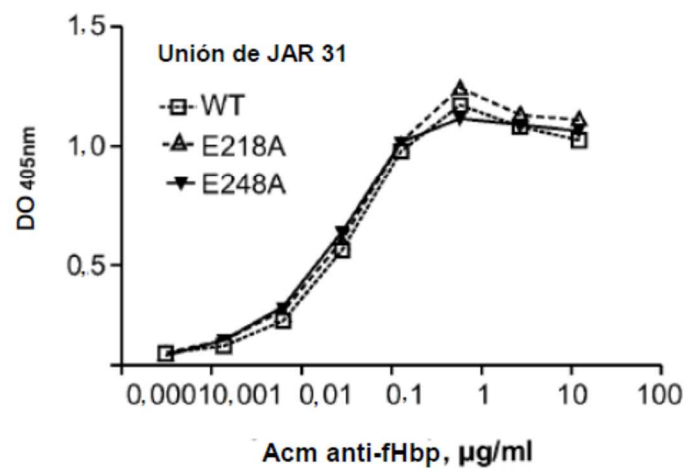
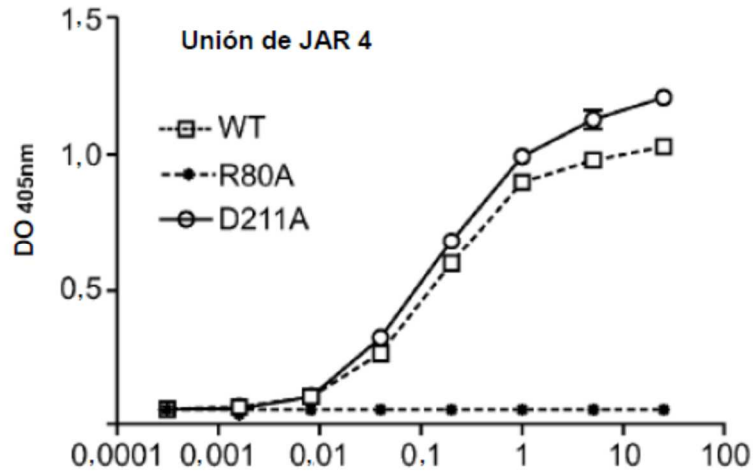


FIG. 24

Unión de JAR 4 a fHbp ID 22 de tipo silvestre y mutantes

Panel A



Panel B

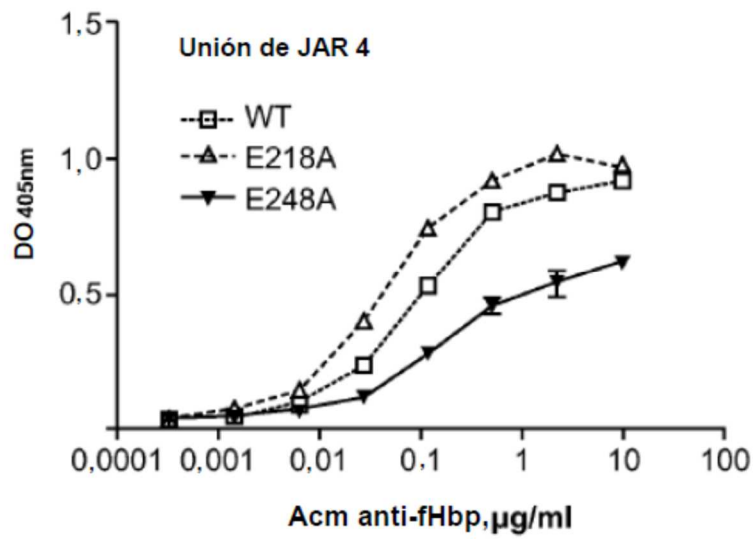
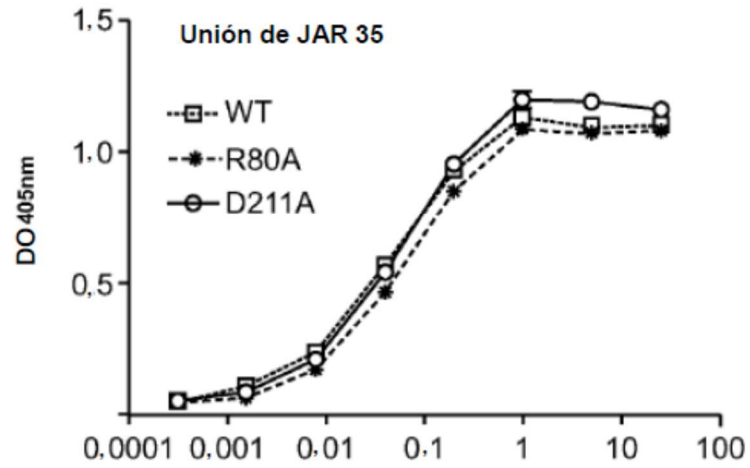


FIG. 25

Unión de JAR 35 a fHbp ID 22 de tipo silvestre y mutantes

Panel A



Panel B

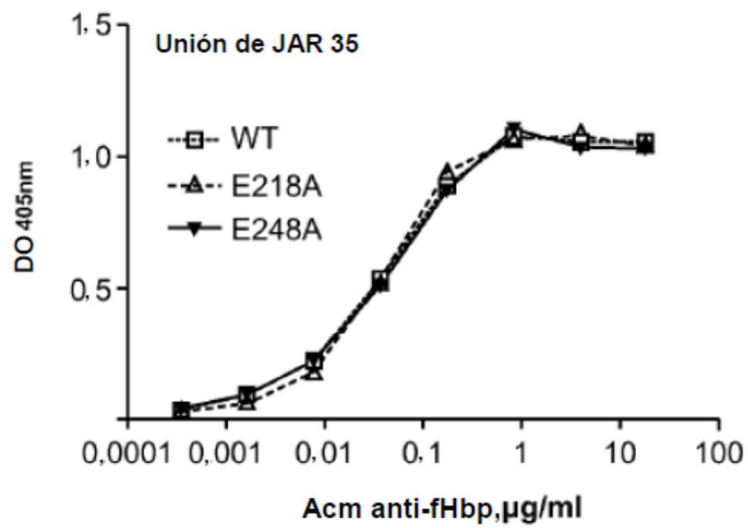


FIG. 26

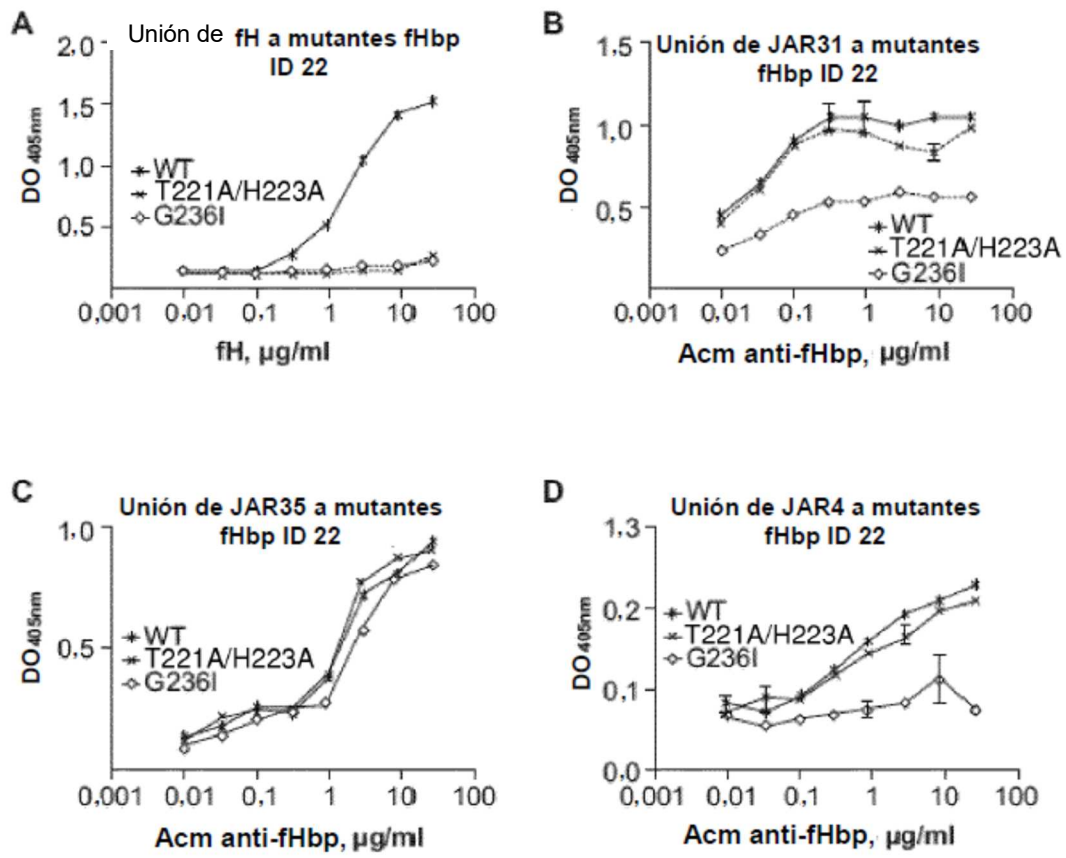


FIG. 27

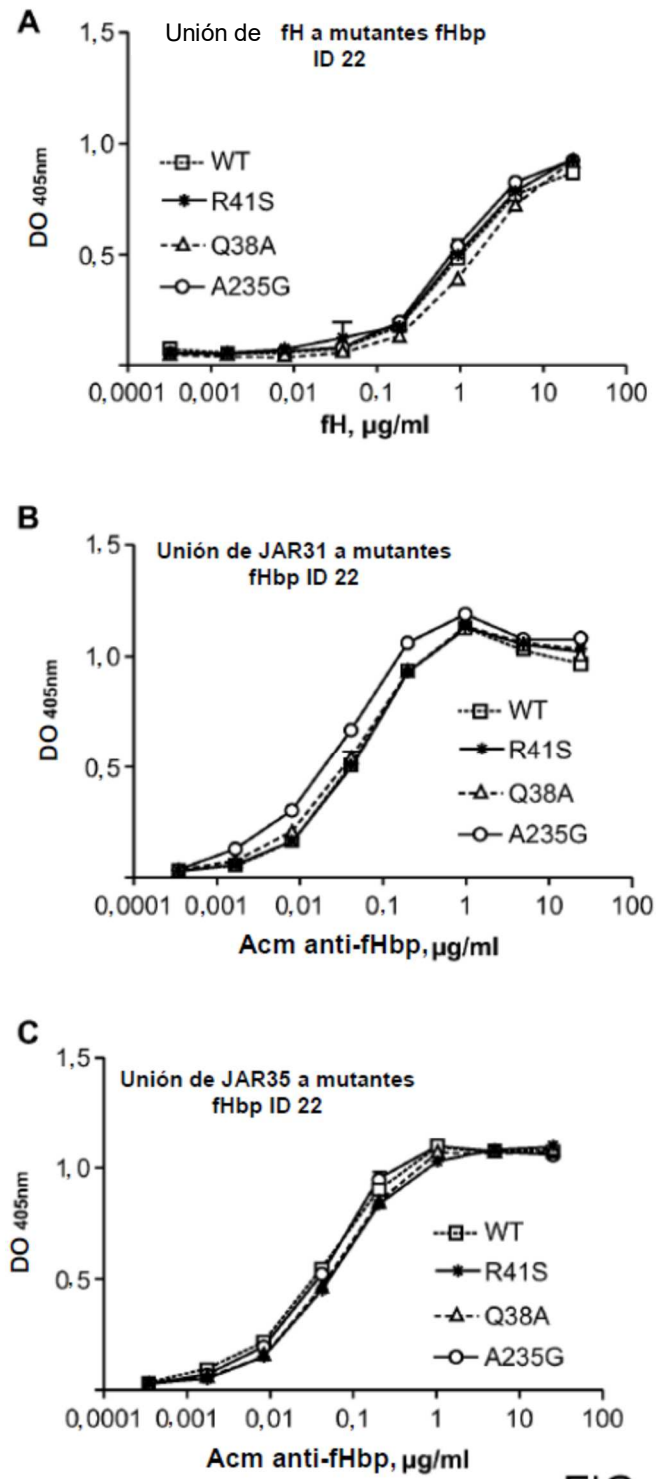


FIG. 28

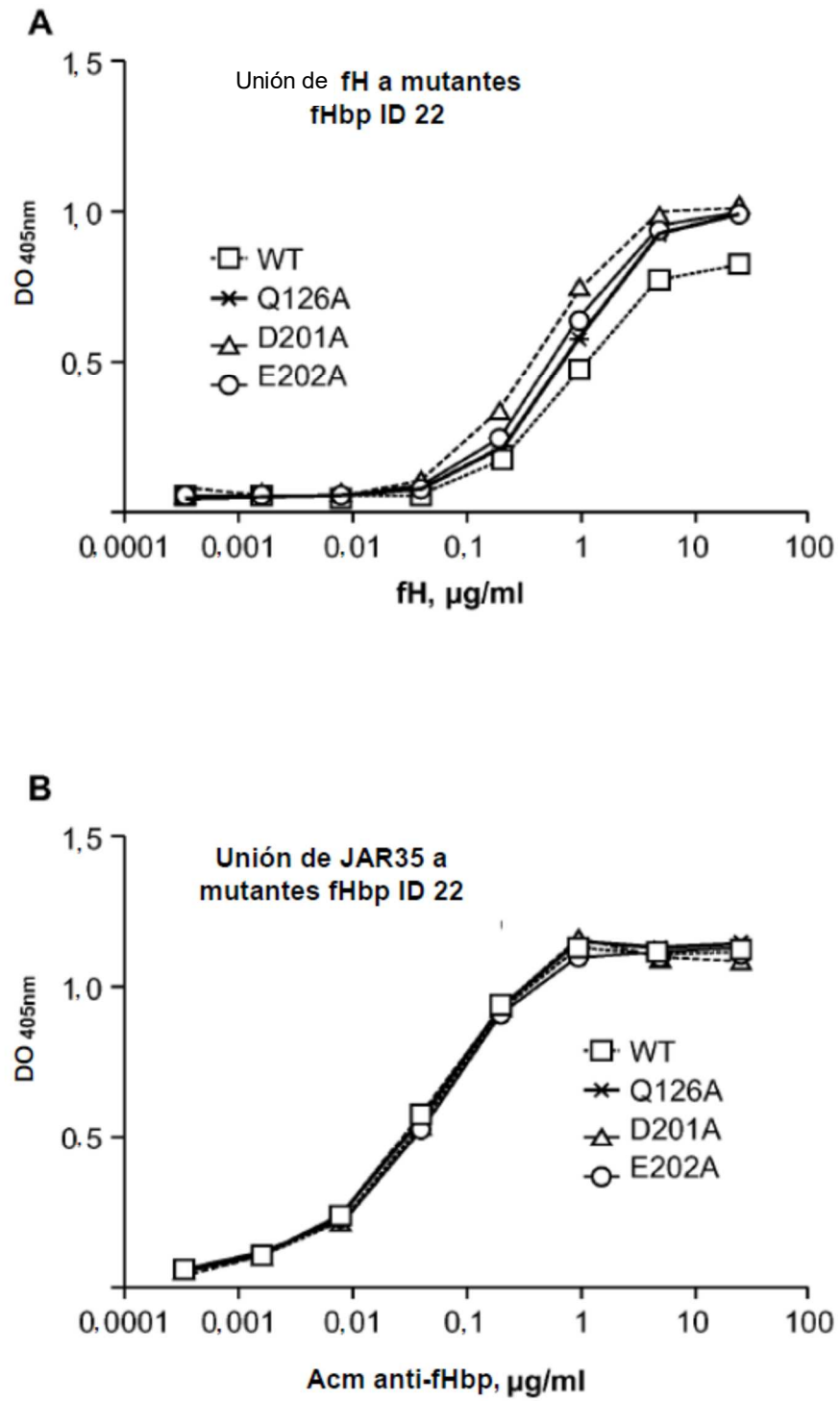


FIG. 29

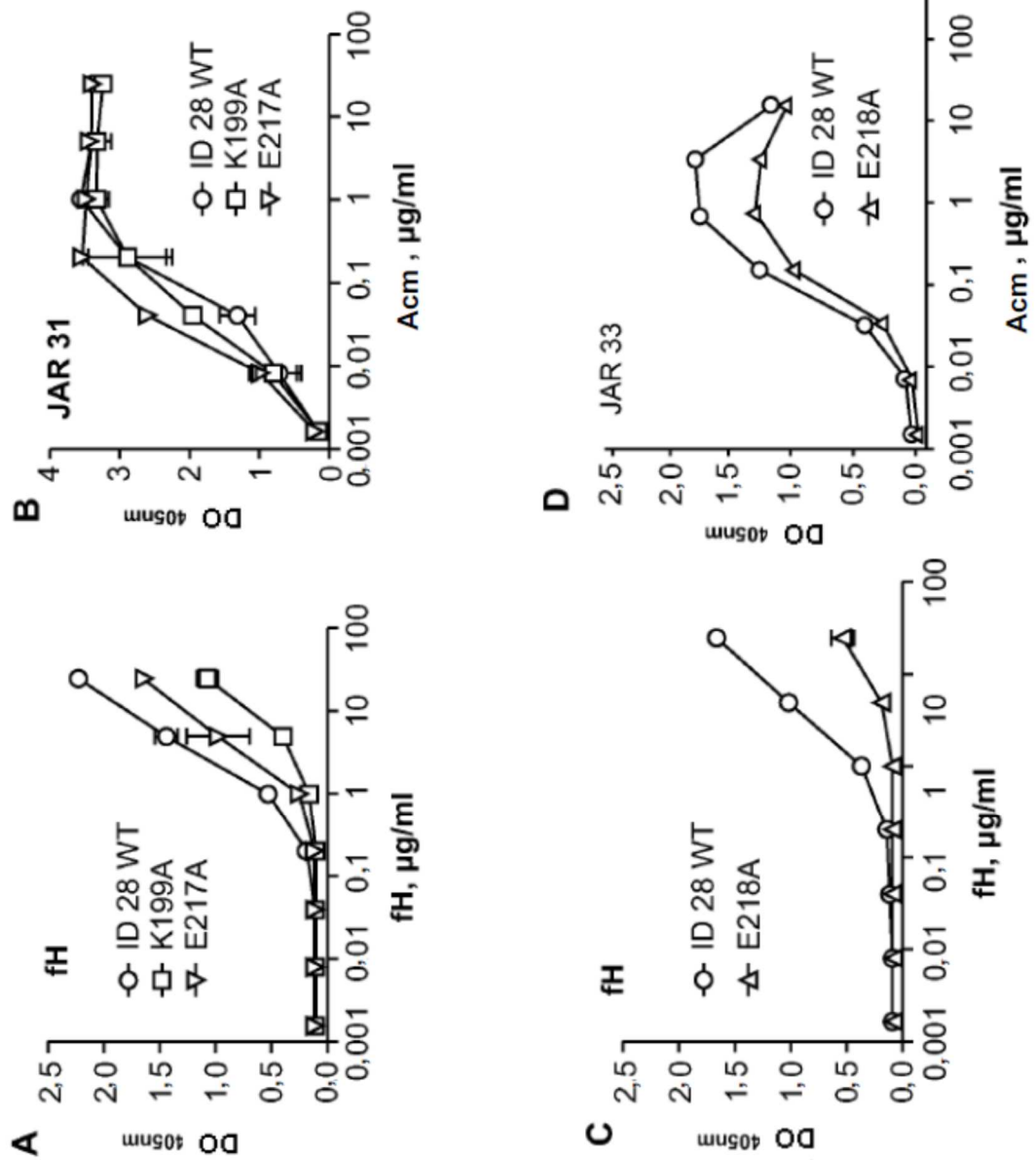


FIG. 30

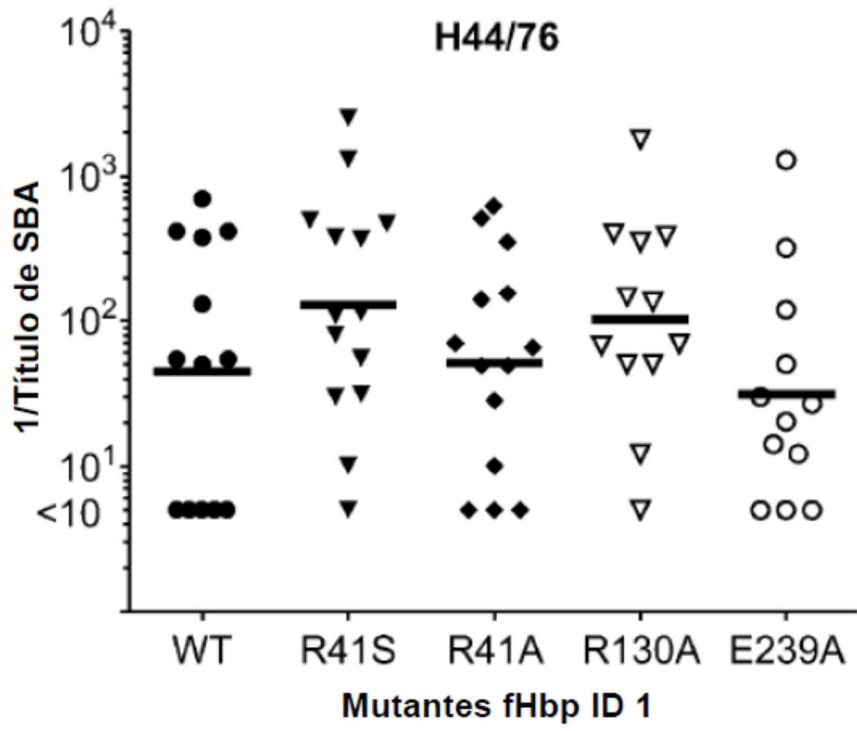


FIG. 31

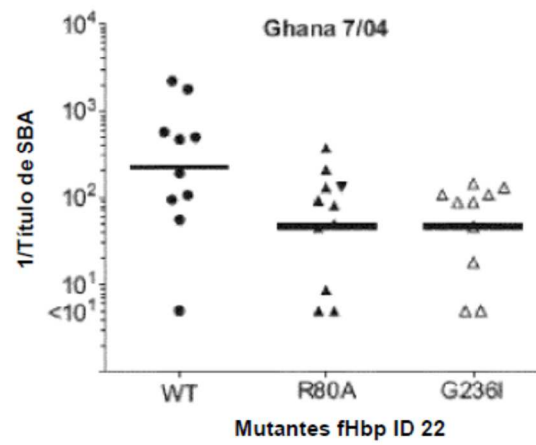
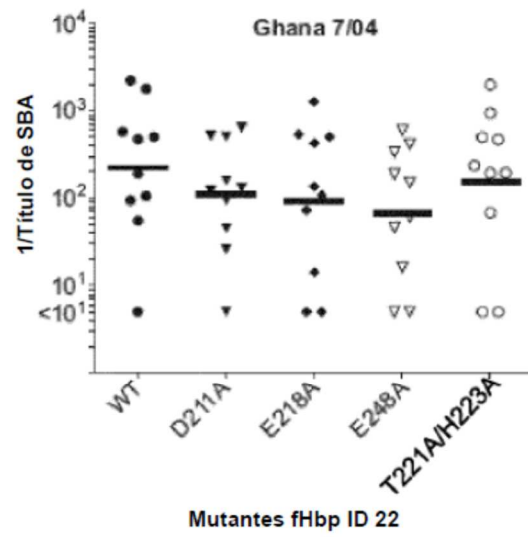


FIG. 32

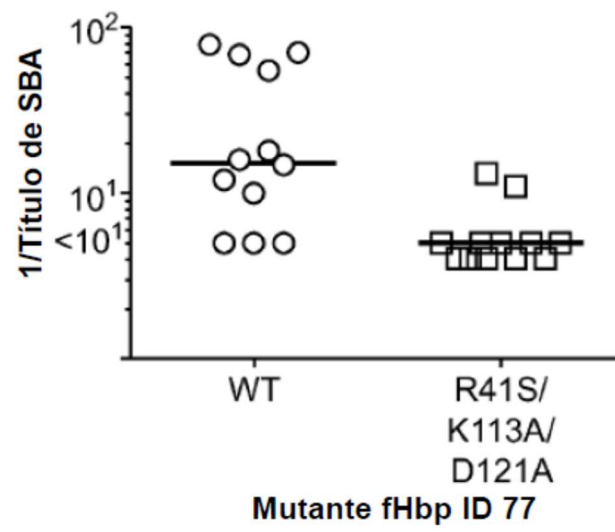


FIG. 33

ID_1 (v.1) CSSGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKCLKLAAQGAEK 55
 ID_22 (v.2) CSS-----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKCLKLAAQGAEK 55
 ID_77 (v.2) CSS-----GGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKCLKLAAQGAEK 55
 ID_28 (v.3) CSSGGGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSLAQGAEK 60
Quimera (ID 1/77) CSS-----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKCLKLAAQGAEK 55

 ID_1 TYGNGD---SLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE 112
 ID_22 TYGNGD---SLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE 112
 ID_77 TYGNGD---SLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE 112
 ID_28 TFKAGDKDNLNTGKLKNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQVYKQSHSALTAFQTE 120
Quimera TYGNGD---SLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE 112

 ID_1 QIQSEHSKGKMAKQFPIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF 172
 ID_22 KINNPDKIDSLINQSRFLVSLGGEHTAFNQLP-SGKAHYHGKAFSSDDPNRRLHYSIDF 171
 ID_77 KINNPDKIDSLINQSRFLVSLGGEHTAFNQLP-DGKAHYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDF 171
 ID_28 KINNPDKIDSLINQSRFLVSLGGEHTAFNQLP-GGKAHYHGKAFSSDDPNRRLHYSIDF 179
Quimera QIQSEHSKGKMAKQFPIGDIAGEHTAFNQLP-DGKAHYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDF 171

 ID_1 AAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHATISGSLVYNQAEKGSYSLGIFGGKAQ 232
 ID_22 TKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYYHLALFGDRAQ 231
 ID_77 AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQ 231
 ID_28 TKKQGYGRIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQ 239
Quimera AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQ 231

 ID_1 EVAGSAEVTNVNGIRHIGLAAKQ 255
 ID_22 EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ 254
 ID_77 EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 254
 ID_28 EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 262
Quimera EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 254

FIG. 34

ID_1	CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDSVVERKNEKIKLAAQGAEK	55
ID_22	CSS-----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDSVVERKNEKIKLAAQGAEK	
ID_77	CSS-----GGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDSVVERKNEKIKLAAQGAEK	
ID_28	CSSGGGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTISAQGAEK	
Quimera	CSS-----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDSVVERKNEKIKLAAQGAEK	
ID_1	TYGNGD---SLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE	112
ID_22	TYGNGD---SLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQDHSVVALQIE	
ID_77	TYGNGD---SLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQDHSVVALQIE	
ID_28	TFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQVYKQNHSAVVALQIE	
Quimera	TYGNGD---SLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE	
ID_1	QIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATVRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDF	172
ID_22	KINNPDKIDSLINQSRFLVSGLGGEHTAFNQLP-SGKAEYHGKAFSSDDPNRRLHYSIDF	
ID_77	KINNPDKIDSLINQSRFLVSGLGGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDF	
ID_28	KINNPDKTDSLINQSRFLVSGLGGEHTAFNQLP-GGKAEYHGKAFSSDDPNRRLHYSIDF	
Quimera	QIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDF	
ID_1	AAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNOAERKGSYSLGIFGGKAQ	232
ID_22	TKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTTRYGGEKGTYYHIALFGDRAQ	
ID_77	AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYYHIALFGDRAQ	
ID_28	TKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYYHIALFGDRAQ	
Quimera	AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEELKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTYYHIALFGDRAQ	
ID_1	EVAGSAEVRKTVNGIRHIGLAAKQ	255
ID_22	EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ	
ID_77	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	
ID_28	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	
Quimera	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	

FIG. 35

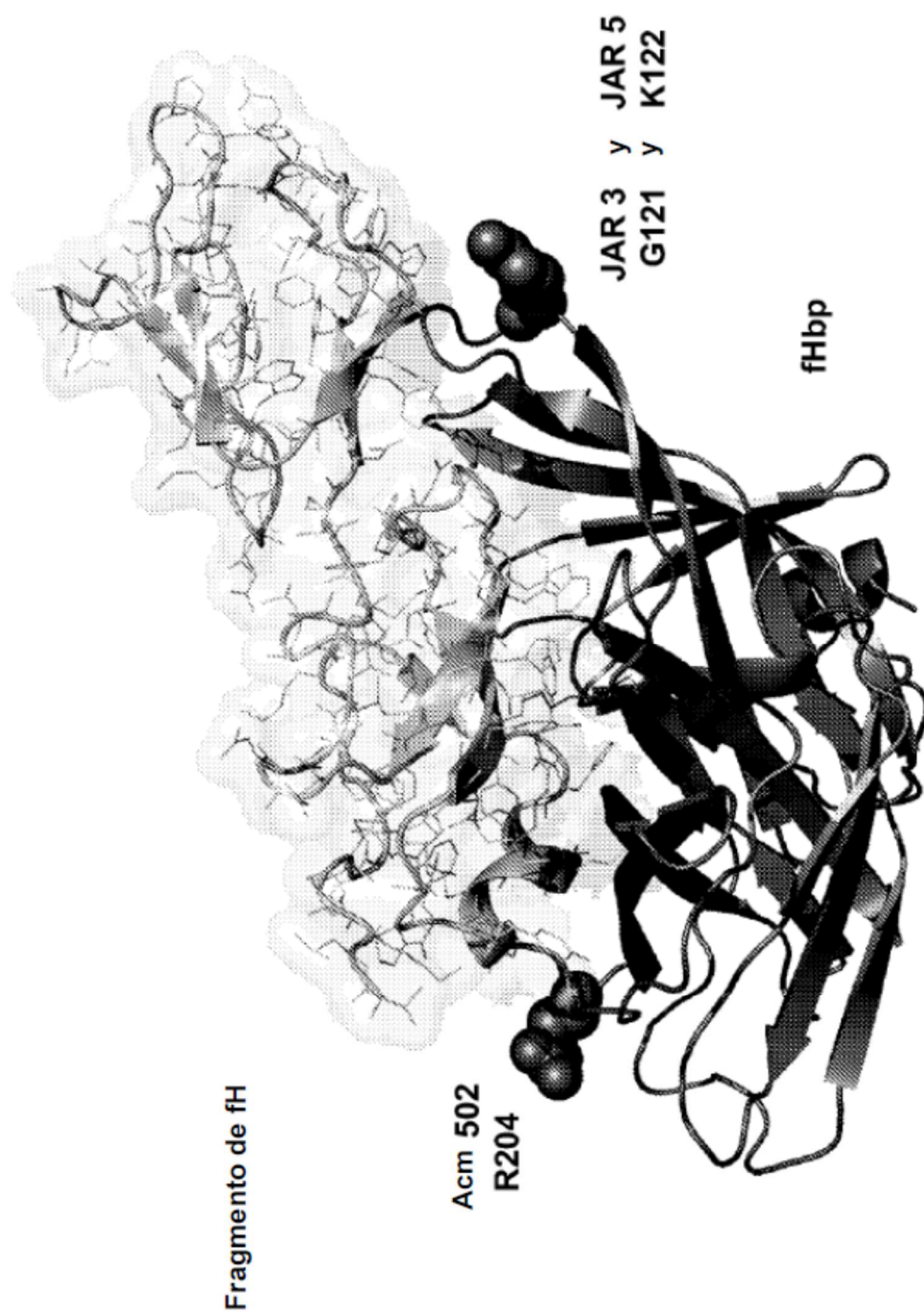


FIG. 36

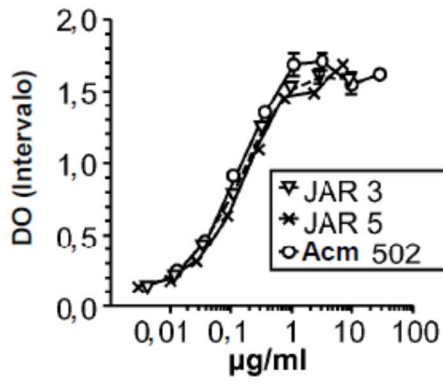


FIG. 37A

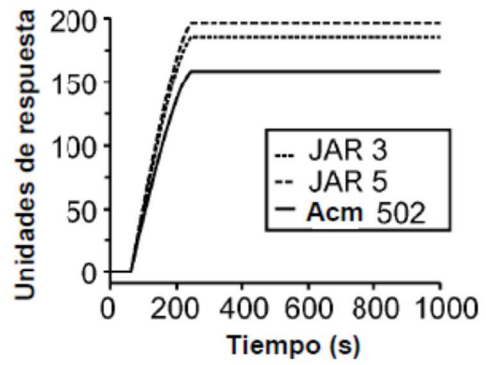


FIG. 37B

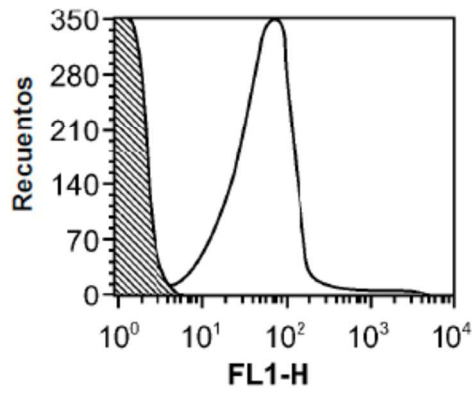


FIG. 37C

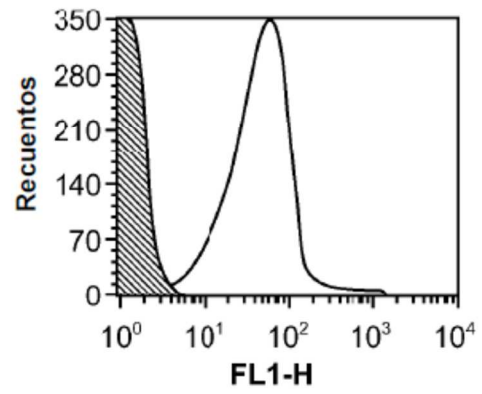


FIG. 37D

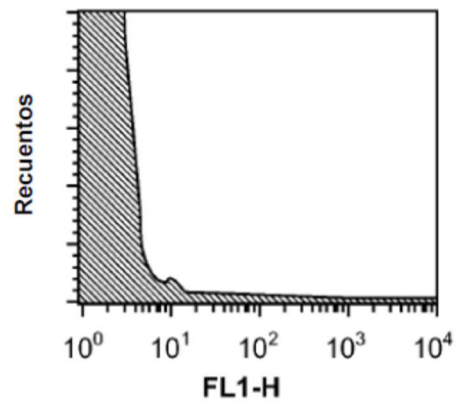


FIG. 38A

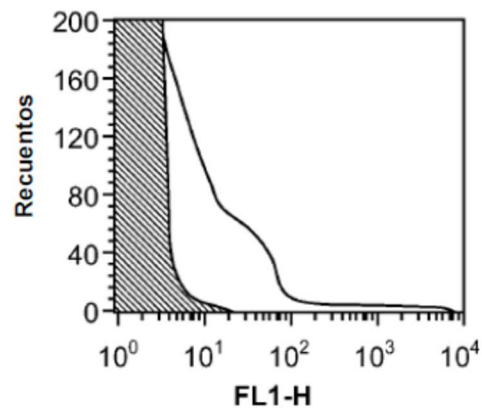


FIG. 38B

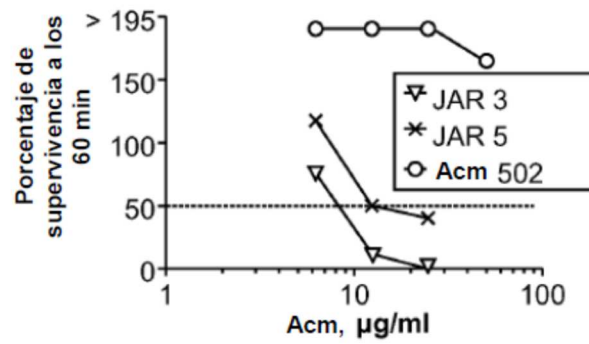


FIG. 38C

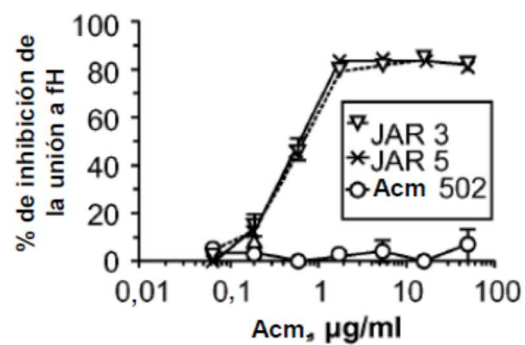


FIG. 39A

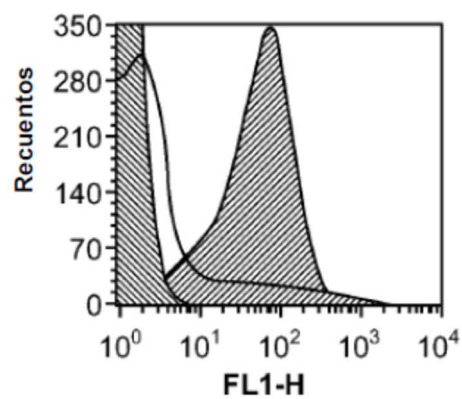


FIG. 39B

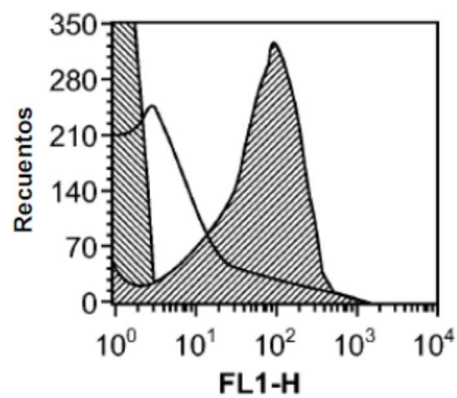


FIG. 39C

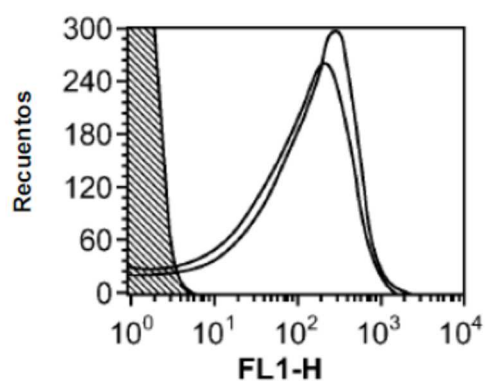


FIG. 40A

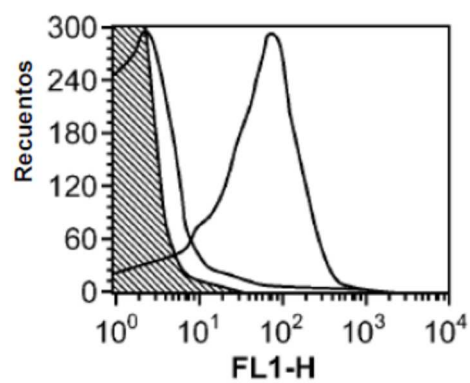


FIG. 40B

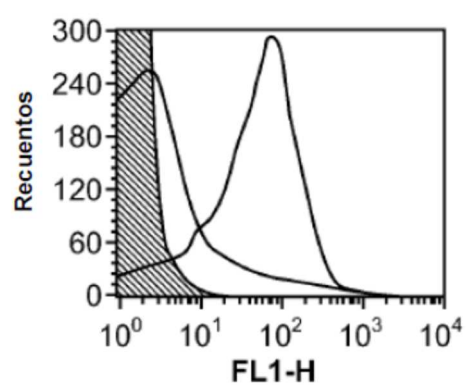


FIG. 40C

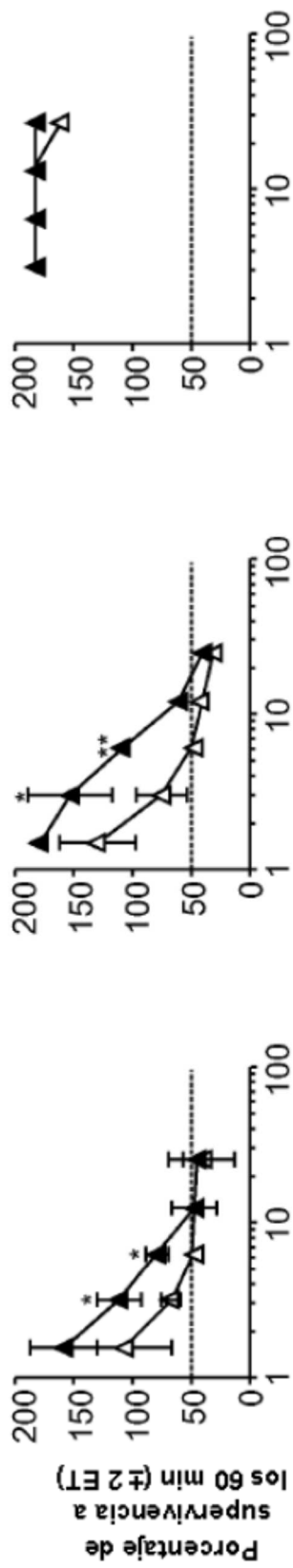


FIG. 41A

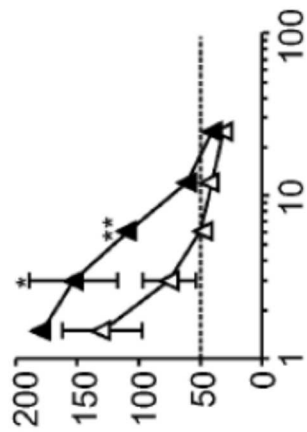


FIG. 41B

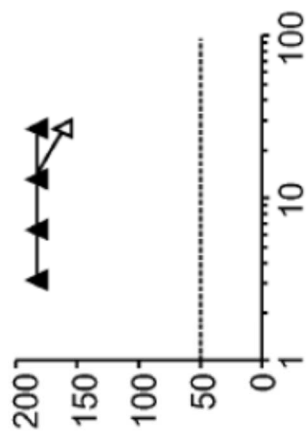


FIG. 41C

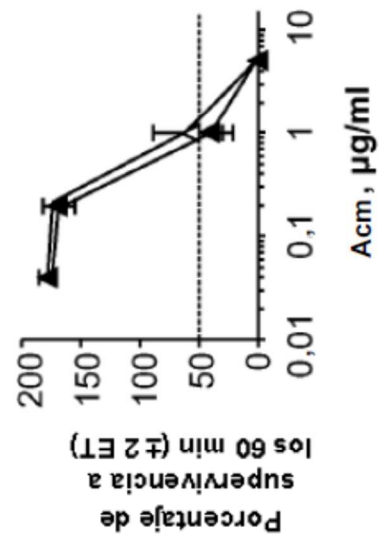


FIG. 41D

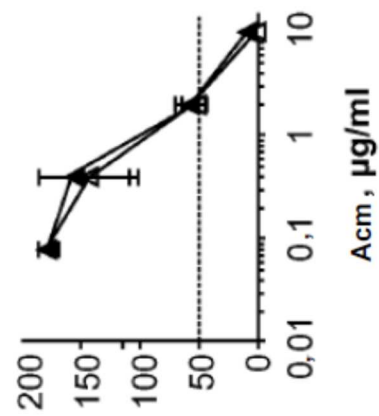


FIG. 41E

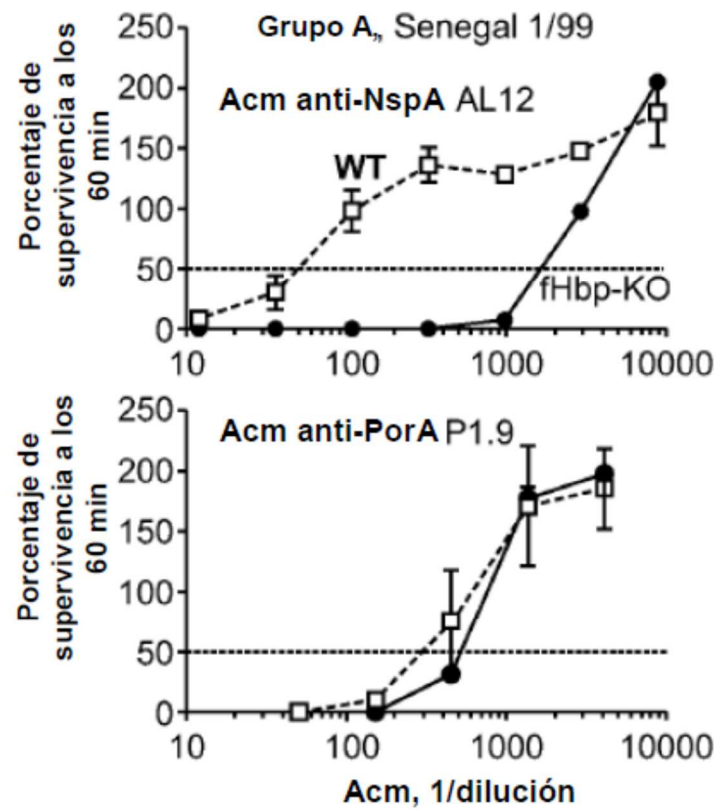


FIG. 42

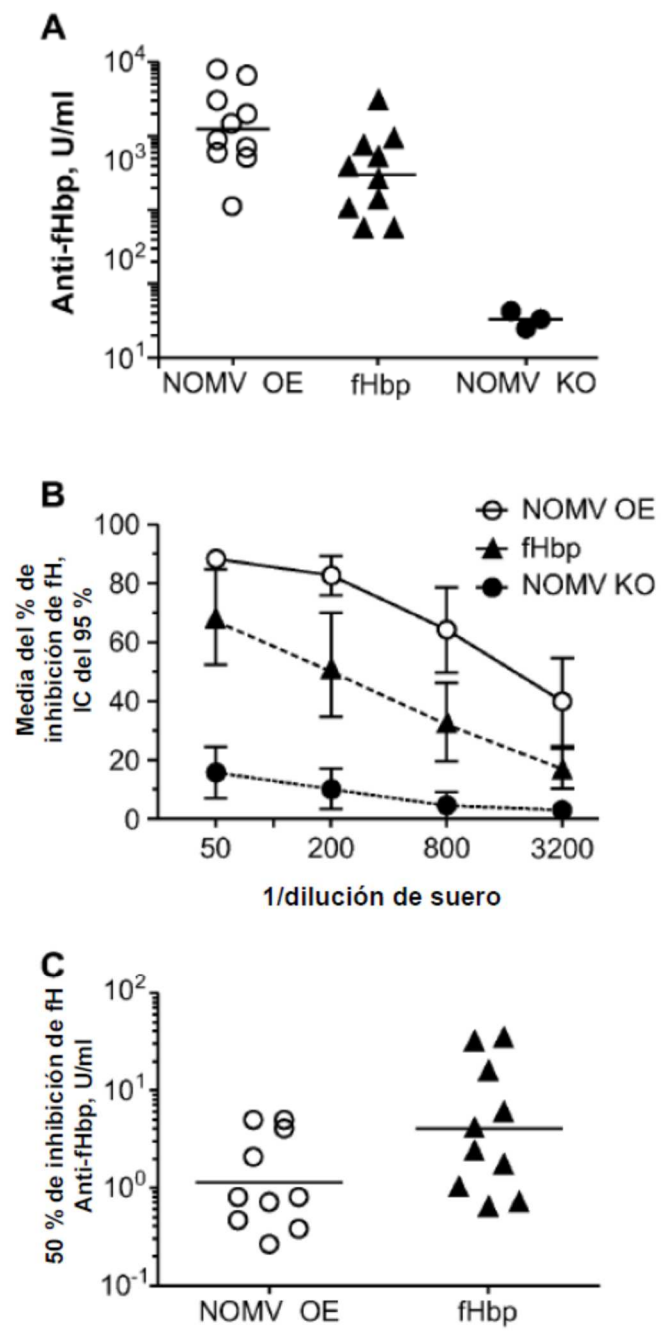


FIG. 43

mkkalatlialalpaalae gasgyvqad aahakassl gsakgfsprl sagyrindlr
61 favdytrykn ykapstdfkl ysigasaiyd fdtqspvkpy lgarlslnra svdlggsdsf
121 sqtsiglgvl tgvsyavtpn vldagyryn yigkvntvkn vrsgelsvgv rvkf

FIG. 44

Péptido ID 1
 CSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKN 70
 DKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTS 140
 FDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTITIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISG 210
 SVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVTNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 1)

Péptido ID 22
 CSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKN 70
 DKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTA 140
 FNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGD 210
 TRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 2)

Péptido ID 28
 CSSGGGSGGGVAAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQAEKTFKAGDKDNS 70
 LNTGKLKNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVS 140
 GLGGEHTAFNQLPGGKAHEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEKKADEK 210
 SHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 3)

Péptido ID 77
 CSSGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKN 70
 DKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTA 140
 FNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDAGGKLTITIDFAAQQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGD 210
 TRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 4)

Péptido ID 15
 CSSGGGSGGGVAAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQAEKTFKAGDKDNS 70
 LNTGKLKNDKISRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIG 140
 DIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLTITIDFAAQQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDE 210
 KHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAA
 KQ (SEQ ID NO: 5)

Quimera I
 cssgggvaadigagladalapldhkdkgqlsltdqsvrkneklklaaqaektyngngdslntgklkn 70
 dkvsrfdfrqievdgqlitlesgefvykqshsalfatqeqidsehgkmvkrqfrigdiagehta 140
 FNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDAGGKLTITIDFAAQQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGD 210
 TRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 8)

FIG. 45