

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.11.21	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L. VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA (SI)	IT
(30) Prioridade(s): 2002.11.22 GB 0227346		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.08.17	(72) Inventor(es): MARIAGRAZIA PIZZA MAURIZIO COMANDUCCI	IT IT
(45) Data e BPI da concessão: 2013.10.02 235/2013	(74) Mandatário: LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598 CHARNECA DA CAPARICA	PT

(54) Epígrafe: **VARIANTES MÚLTIPLAS DA PROTEÍNA MENINGOCÓCICA NMB1870**

(57) Resumo:

A PROTEÍNA MENINGOCÓCICA NMB 1870 FOI DESCRITA NA TÉCNICA ANTERIOR. OS INVENTORES DESCOBRIRAM QUE A NMB 1870 É UM ANTIGÉNIO EFICAZ PARA INDUZIR RESPOSTAS DE ANTICORPOS ANTI-MENINGOCOCO, E QUE É EXPRESSA EM TODOS OS SEROGRUPOS DE MENINGOCOCOS. QUARENTA E DUAS SEQUÊNCIAS DIFERENTES DE NMB 1870 FORAM IDENTIFICADAS, E ESTES GRUPOS EM TRÊS VARIANTES. O SORO PRODUZIDO CONTRA UMA DETERMINADA VARIANTE É BACTERICIDA DENTRO DO MESMO GRUPO DE VARIANTES, MAS NÃO É ATIVO CONTRA AS ESTIRPES QUE EXPRESSAM UMA DAS OUTRAS DUAS VARIANTES OU SEJA, É DE PROTEÇÃO CRUZADA INTRA-VARIANTE, MAS NÃO DE PROTEÇÃO CRUZADA INTER-VARIANTE. PARA UMA EFICÁCIA MÁXIMA CRUZADA DA ESTIRPE, POR CONSEQUENTE, A INVENÇÃO UTILIZA MISTURAS QUE COMPREENDEM DIFERENTES VARIANTES DE NMB 1870.

RESUMO

VARIANTES MÚLTIPLAS DA PROTEÍNA MENINGOCÓCICA NMB1870

A proteína meningocócica NMB 1870 foi descrita na técnica anterior. Os inventores descobriram que a NMB 1870 é um antigénio eficaz para induzir respostas de anticorpos anti-meningococo, e que é expressa em todos os serogrupos de meningococos. Quarenta e duas sequências diferentes de NMB 1870 foram identificadas, e estes grupos em três variantes. O soro produzido contra uma determinada variante é bactericida dentro do mesmo grupo de variantes, mas não é ativo contra as estirpes que expressam uma das outras duas variantes ou seja, é de proteção cruzada intra-variante, mas não de proteção cruzada inter-variante. Para uma eficácia máxima cruzada da estirpe, por conseguinte, a invenção utiliza misturas que compreendem diferentes variantes de NMB 1870.

DESCRIÇÃO

VARIANTES MÚLTIPLAS DA PROTEÍNA MENINGOCÓCICA NMB1870

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção está no campo da vacinação e, em particular, a vacinação contra a doença causada por bactérias patogénicas no género *Neisseria*, tais como *N. meningitidis* (meningococo).

ESTADO DA TÉCNICA

A *Neisseria meningitidis* é uma bactéria Gram-negativa encapsulada que coloniza o trato respiratório superior de aproximadamente 10% da população humana. Aproximadamente uma vez em cada 10000 pessoas colonizadas (ou uma vez em 100000) a bactéria entra na corrente sanguínea onde se multiplica e causa septicemia. A partir do fluxo de sangue a bactéria pode atravessar a barreira sangue-cérebro e causar meningite. Ambas as doenças são devastadoras e podem matar 5-15% das crianças afetadas e jovens adultos em poucas horas, apesar da disponibilidade de antibióticos eficazes. Até 25% dos que sobrevivem ficam com sequelas permanentes.

A prevenção da doença foi parcialmente realizada através da vacinação. A imunização foi possível, em 1969, quando se descobriu que a proteção contra a doença se correlaciona com a presença de anticorpos de soro capazes de induzir a morte mediada pelo complemento de bactérias, e que o polissacarídeo capsular purificado foi capaz de induzir anticorpos contra estes. Apesar de polissacáridos e de conjugados de vacinas estarem disponíveis contra os serogrupos A, C, W135 e Y, esta abordagem não pode ser aplicada para o serogrupo B, porque o polissacarídeo

capsular é um polímero de ácido polisiálico, que é um antigénio próprio no ser humano. Para desenvolver uma vacina contra o serogrupo B, proteínas de superfície expostas contidas nas vesículas de membrana externa (OMVs) têm sido utilizadas. Estas vacinas provocam respostas de anticorpos séricos bactericidas e protegem contra a doença, mas não conseguem induzir proteção cruzada da estirpe [1].

A sequência completa do genoma de *N. meningitidis* do serogrupo B foi publicada [2], e tem sido submetido a análise, a fim de identificar os antigénios da vacina [3]. A sequência completa do genoma do serogrupo A de *N. meningitidis* é também conhecido [4], e a sequência completa do genoma da estirpe da *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 está disponível [5]. As referências 6-9 divulgam proteínas de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*, e aproximações à expressão destas proteínas são reveladas nas referências 10 a 12.

É um objetivo da invenção proporcionar novas e melhoradas composições para proporcionar imunidade contra a doença e/ou infeção meningocócica, em particular para o serogrupo B.

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

Uma das 2200 proteínas divulgadas na referência 2 é a 'NMB1870'. A proteína foi originalmente divulgada como proteína '741' da estirpe MC58 [SEQ IDs 2535 e 2536 na referência 8; SEQ ID 1 aqui], e também tem sido referida como "CNA1870" [seguindo a referência 3] ou como "ORF2086" [13].

A referência 13 divulga várias sequências NMB1870, e divide-as em subfamílias 'A' e 'B'. Estas subfamílias podem ser combinadas. A referência 13, não divulga combinações que são adjuvantes com um sal de alumínio, e não revela a junção de subfamílias A e B, tal como uma proteína de fusão.

Foi agora encontrado que NMB1870 é um antigénio extremamente eficaz para induzir respostas de anticorpos anti-meningococo, e que é expressa em todos os serogrupos de meningococos. A NMB1870 foi encontrada em todas as estirpes de meningococo testadas até à data. Quarenta e duas sequências NMB1870 meningocócicas diferentes foram identificadas, e verificou-se que estas sequências se agrupam em três variantes. Além disso, verificou-se que o soro produzido contra uma determinada variante é bactericida dentro do mesmo grupo de variantes, mas não é ativo contra as estirpes que expressam uma das outras duas variantes, isto é, há proteção cruzada intra-variante, mas não proteção cruzada inter-variante. Para a eficácia máxima cruzada da estirpe, portanto, mais do que uma variante deve ser utilizada para a imunização de um paciente.

Por conseguinte, a invenção proporciona uma composição que compreende os dois antigénios seguintes:

(a) uma primeira proteína, que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma %a de identidade de sequência com a SEQ ID 24; e

(b) uma segunda proteína que compreende uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos uma %b de identidade de sequência com a SEQ ID 33, e também incluindo um adjuvante de sal de alumínio.

O valor de *a* é, pelo menos, 85, por exemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, ou mais. O valor de *b* é de pelo menos 85, por exemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, ou mais. Os valores de *a* e *b* não são intrinsecamente relacionados entre si.

As proteínas (a) e (b) são, cada uma, intimamente relacionadas com as suas sequências de 'protótipo', mas não são tão intimamente relacionadas entre si.

A mistura pode, de preferência produzir uma resposta de anticorpo que é bactericida contra pelo menos uma estirpe de *N. meningitidis* de cada um de pelo menos dois dos três grupos de estirpes que se seguem:

(a) MC58, gb185 (= M01-240185), M4030, m2197, m2937, iss1001, NZ394/98, 67/00, 93/114, bz198, m1390, nge28, lnp17592, 00-241341, F6124, 205900, m198/172, bz133, gb149 (= M01-240149), nm008, nm092, 30/00, de 39/99, 72/00, 95330, bz169, bz83, cu385, H44/76, m1590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44/89, 14847.

(b) 961-5945, 2996, 96217, 312294, 11327, a22, gb013 (= M01-240013), e32, m1090, m4287, 860,800, 599, 95N477, 90-18311, c11, m986, m2671, 1000, m1096, m3279, bz232, dk353, m3697, ngh38, L93/4286.

(c) M1239, 16889, gb355 (= M01-240355), M3369, m3813, ngp165.

Por exemplo, a mistura pode induzir uma resposta bactericida eficaz contra cada uma das estirpes de *N. meningitidis* do serogrupo B MC58, 961-5945 e M1239.

A mistura pode, de preferência produzir uma resposta de anticorpo que é bactericida contra pelo menos 50% das estirpes de meningococo B clinicamente relevantes (por exemplo, pelo menos, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais).

A mistura pode, de preferência produzir uma resposta de anticorpo que é bactericida contra estirpes do serogrupo B de *N. meningitidis* e estirpes de pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4) dos serogrupos A, C, W135 e Y.

A mistura pode, de preferência produzir uma resposta de anticorpo que é bactericida contra estirpes de *N.gonococcus* e/ou *N.cinerea*.

A mistura pode, de preferência produzir uma resposta de anticorpo que é bactericida contra estirpes de, pelo menos, dois dos três ramos principais do dendrograma mostrados na Figura 9 (ou seja, o dendrograma obtido através da análise SEQ IDs 1 a 23 pelo algoritmo Kimura & Jukes-Cantor).

A mistura pode, de preferência produzir uma resposta de anticorpo que é bactericida contra estirpes de *N. meningitidis*, em, pelo menos, dois (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7) das linhagens hipervirulentas ET-37, ET-5, conjunto A4, linhagem 3, subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-e 1 [14, 15].

As composições da invenção podem adicionalmente induzir respostas de anticorpos bactericidas contra uma ou mais linhagens hiperinvasivas.

A mistura pode, de preferência produzir uma resposta de anticorpo que é bactericida contra estirpes de *N. meningitidis*, em, pelo menos, pelo menos, dois (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7) dos seguintes tipos de sequências multilocos: ST1, ST4, ST5, ST8, ST11, ST32 e

ST41 [16]. A mistura pode também provocar uma resposta de anticorpo que é bactericida contra estirpes ST44.

As respostas de anticorpos bactericidas são convenientemente medidas em ratinhos e são um indicador de nível de eficácia da vacina [por exemplo, ver o final da nota 14 da referência 3]. A composição não necessita de induzir anticorpos bactericidas contra cada estirpe MenB dentro das linhagens especificados ou MLST; mas sim, para um determinado grupo de quatro de mais estirpes de meningococo do serogrupo B dentro de uma linhagem hipervirulenta particular, ou MLST, os anticorpos induzidos pela composição são bactericidas contra pelo menos 50% (por exemplo, de 60%, 70%, 80%, 90% ou mais) do grupo. Grupos preferidos de estirpes incluirão estirpes isoladas em pelo menos quatro dos seguintes países: GB, AU, CA, US, NZ, NL, BR, e CU. O soro de preferência tem um título bactericida de, pelo menos, 1024 (por exemplo, 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} ou superior, de preferência, pelo menos, 2^{14}), ou seja, o soro é capaz de matar pelo menos 50% das bactérias de teste de uma estirpe particular quando diluído 1/1024, por exemplo, tal como descrito no final da nota 14 da referência 3.

Lipoproteínas

NMB1870 é, naturalmente, uma lipoproteína de *N. meningitidis*. Também foi encontrada ser lipidada, quando expressa em *E. coli*.

É preferível que uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) proteínas NMB1870 incluídas nas composições da invenção seja uma lipoproteína.

De preferência, a lipoproteína tem um resíduo de cisteína N-terminal, ao qual o lípido está ligado de forma covalente. Para preparar a lipoproteína via expressão bacteriana geralmente requer-se um péptido de sinal apropriado N-terminal de lipidação direta por transferase de diacilgliceril, seguido por clivagem por lipoproteína específica SPASE (tipo II). Enquanto a lipoproteína da invenção pode ter uma cisteína N-terminal (por exemplo, SEQ IDs 24 a 45), por conseguinte, será um produto de modificação pós-tradução de uma proteína nascente que tem a metionina N-terminal habitual (por exemplo, SEQ IDs 1 a 22).

A lipoproteína pode ser associada com uma bicamada lipídica e pode ser solubilizada com detergente.

Sequências

As proteínas NMB1870 úteis para a presente invenção compreendem uma sequência de aminoácidos com uma identidade de sequência de uma ou mais das SEQ ID N°s 1 a 23, e/ou compreendendo um fragmento de uma ou mais das SEQ ID N°s 1 a 23.

Mais, as proteínas NMB 1870 úteis para a presente invenção compreendem uma sequência de aminoácidos com uma identidade de sequência de uma ou mais das SEQ ID N°s 1-252 da referência 13, e/ou compreendendo um fragmento de uma ou mais das SEQ ID N°s 1-252 da referência 13. As SEQ ID N°s 300-302 da referência 13 fornecem sequências de consenso, e as SEQ ID N°s 254-299 são fragmentos.

As sequências de aminoácidos preferidos com <100% de identidade com as SEQ ID N°s 1 a 23 são variantes alélicas,

homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes etc. destes. Prefere-se que uma ou mais das diferenças em variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos ou mutantes, em comparação com as SEQ ID N°s 1 a 23, envolvam uma substituição de aminoácidos conservadora, ou seja, a substituição de um aminoácido por outro que tem uma cadeia lateral relacionada. Aminoácidos geneticamente codificados são geralmente divididos em quatro famílias: (1) acídica, isto é, aspartato, glutamato; (2) básica, por exemplo, lisina, arginina, histidina; (3) não-polar, ou seja, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; e (4) polar sem carga, ou seja, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptofano e tirosina são por vezes classificadas em conjunto como aminoácidos aromáticos. Em geral, a substituição de aminoácidos individuais dentro dessas famílias, não tem um efeito importante sobre a atividade biológica.

Um subconjunto preferido de proteínas não inclui a sequência de aminoácidos TRSKP (SEQ ID N°: 70) ou TRSKPV (SEQ ID N°: 71) dentro de 10 aminoácidos da proteína N-terminal. Outro subconjunto preferido de proteínas não inclui a sequência PSEPPFG de aminoácidos (SEQ ID N°: 72) dentro de 10 aminoácidos da proteína N-terminal.

Outro subconjunto preferido de proteínas para utilização com a invenção inclui a sequência de aminoácidos (Gli)_n, onde n é 1, 2, 3, 4 ou mais, por exemplo, a SEQ ID N°: 73.

Uma característica de proteínas preferenciais da presente invenção é a capacidade para induzir anticorpos bactericidas anti-meningocócicos após a administração a um animal hospedeiro.

As proteínas podem ser preparadas por vários meios, por exemplo, por síntese química (pelo menos em parte), por digestão com proteases de polipéptidos mais longos, por tradução a partir de ARN, por purificação a partir de cultura de células (por exemplo, a partir da expressão recombinante ou a partir da cultura de *N. meningitidis*) etc. A expressão heteróloga num hospedeiro *E. coli* é um percurso de expressão preferencial (por exemplo, estirpes DH5a, BL21 (DE₃), BLR, etc.).

As proteínas da invenção podem ser ligadas ou imobilizadas num suporte sólido.

As proteínas da invenção podem compreender um marcador detectável, por exemplo, um marcador radioativo, um marcador fluorescente, ou um marcador de biotina. Isto é particularmente útil em técnicas de imunoensaio.

As proteínas podem revestir várias formas (por exemplo, nativas, fusões, glicosiladas, não glicosiladas, lipidadas, pontes dissulfeto etc.). As proteínas são, de preferência, proteínas meningocócicas.

As proteínas são de preferência preparadas na forma substancialmente pura ou na forma substancialmente isolada (ou seja, substancialmente livre de outras proteínas de *Neisseria* ou de células hospedeiras). Em geral, as proteínas são fornecidas num ambiente que não ocorre naturalmente, por exemplo, são separadas do seu ambiente de ocorrência natural. Em certas formas de realização, a proteína do sujeito está presente numa composição que é enriquecida para a proteína, em comparação com um controlo. Como tal, a proteína purificada é fornecida, através do qual por purificada entende-se que a proteína está presente numa composição que é substancialmente isenta de outras

proteínas expressas, onde por substancialmente livre se entende que menos de 90%, geralmente menos de 60% e mais usualmente menos de 50% da composição é constituída por outras proteínas expressas.

O termo "proteína" refere-se a polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender os aminoácidos modificados e pode ser interrompido por não-aminoácidos. Os termos englobam também um polímero de aminoácidos que foi modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, a formação da ligação dissulfureto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação ou qualquer outra manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente de marcação. Também estão incluídos dentro da definição, por exemplo, as proteínas que contenham um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. As proteínas podem ocorrer como cadeias simples ou cadeias associadas.

A invenção pode utilizar proteínas que compreende um ou mais das SEQ ID N°s 77, 79, 82, 83, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 e 94.

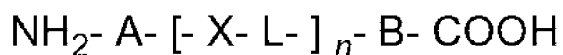
Proteínas híbridas e em tandem

Como mencionado acima, NMB 1870 pode ser utilizada sob a forma de uma proteína de fusão, embora as proteínas podem também ser expressas de outra forma que não numa proteína de fusão (por exemplo, sem a GST, MBP, his-tag ou semelhante).

As proteínas de fusão podem ter uma extremidade C-terminal e/ou N-terminal do parceiro de fusão. Sempre que um parceiro de fusão N-terminal é usado com as SEQ IDs 1 a 23, o perito na técnica realizará que o codão de iniciação será (se incluído) expresso como uma valina, porque GTG é traduzido como valina, excepto quando é utilizado como codão de partida, no caso em que é traduzido como N-formil-metionina.

Adequados parceiros de fusão N-terminal incluem peptídeos líder de outras proteínas (particularmente outras lipoproteínas), que podem ser substituídos para os péptidos líder naturais NMB1870 (ou seja, a sequência antes da cisteína N-terminal poder ser substituída com um outro péptido líder de interesse). Exemplos são as sequências que compreendem a SEQ ID 46, e a sequência líder de lipoproteína *H.influenzae* P4 [por exemplo, 17].

Um tipo preferido de proteína de fusão é revelado nas referências 10, 11 e 12, em que duas ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6 ou mais) proteínas de *Neisseria* são unidas de tal modo que são traduzidas como uma única cadeia de polipéptido. Em geral, essas proteínas híbridas podem ser representadas pela fórmula:



em que X é uma sequência de aminoácidos que compreende uma sequência de *Neisseria*, L é uma sequência de aminoácido ligante opcional, A é uma sequência de aminoácidos N-terminal opcional, B é uma sequência de aminoácidos C-terminal opcional, e n é um número inteiro maior do que 1. O valor de n é entre 2 e X, e o valor de x é tipicamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. De preferência, n é 2, 3 ou 4, que

é mais preferivelmente 2 ou 3, com maior preferência, $n = 2$.

De acordo com a presente invenção, pelo menos uma das porções -X- é uma sequência NMB1870 como definido acima. Em algumas proteínas híbridas, as proteínas referidas como "em tandem", pelo menos um das porções -X- tem identidade de sequência a, pelo menos, uma das outras porções X, *por exemplo*, X_1 é a SEQ ID N°: 24 e X_2 representa a SEQ ID N°: 25. São preferidas as proteínas, em que duas ou três das três variantes NMB 1870 são unidas como uma proteína em tandem.

Para porções de X, diferentes de X_1 , é preferível que o péptido líder nativo seja omitido, em particular onde X_1 não é uma sequência NMB1870. Numa forma de realização, os péptidos líder serão excluídos, excepto para a porção -X- localizada na extremidade N-terminal da proteína híbrida, ou seja, o péptido líder de X_1 será retido, mas os peptídeos líder de $X_2 \dots X_n$ vão ser omitidos. Isto é equivalente à exclusão de todos os peptídeos líder e à utilização do péptido líder X_1 como porção -A-.

As sequências NMB1870 preferenciais para utilização como porções -X- são truncadas até e incluindo a sequência de poli-glicina encontrada perto do N-terminal maduro, *por exemplo*, a sequência de NMB1870 começará VAA ... (ou IAA ... para a estirpe m3813). Tais sequências NMB 1870 incluem as SEQ ID N°s 80, 81 e 84.

Para cada uma das ocorrências de n [-X-L-], a sequência de aminoácidos de ligação -L- pode estar presente ou ausente. *Por exemplo*, quando $n = 2$, o híbrido pode ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, etc. Sequências de aminoácidos ligantes -L- serão,

tipicamente, de curta duração (por exemplo, 20 ou menos aminoácidos, ou seja, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem sequências peptídicas curtas que facilitam a clonagem, ligantes de poli-glicina (isto é, Gly_n em que $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais), e as etiquetas de histidina (ou seja, onde His_n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais). Outras sequências de aminoácido ligante adequadas serão evidentes para os peritos na técnica. Um ligante útil é GSGGGG (SEQ ID N°: 144), com o dipeptídeo Gly-Ser formado a partir de um local de restrição *Bam*HI, auxiliando, assim, a clonagem e manipulação, e o tetrapéptido Gli₄ (SEQ ID N°: 73) é um outro ligante poli-glicina típico. Um outro ligante útil é a SEQ ID N°: 78.

-A- é uma sequência de aminoácidos N-terminal opcional. Esta será tipicamente curta (por exemplo, 40 ou menos aminoácidos, ou seja, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem sequências líder para dirigir o tráfico da proteína, ou sequências peptídicas curtas que facilitam a clonagem ou a purificação (por exemplo, etiquetas de histidina, isto é, Hid_n, onde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais). Outras sequências de aminoácidos N-terminal adequados serão evidentes para os peritos na técnica. Se X₁ carece da sua própria metionina N-terminal, -A- pode proporcionar um tal resíduo de metionina na proteína traduzida (por exemplo, -A- é um único resíduo de Met). A porção -A- útil para expressar NMB1870 é a SEQ ID N°: 86. Em lipoproteínas maduras, -A-, de preferência proporciona uma cisteína N-terminal (por exemplo, -A- é um único resíduo de Cys).

-B- é uma sequência de aminoácidos C-terminal opcional. Esta será tipicamente curta (por exemplo, 40 ou menos aminoácidos, ou seja, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem sequências para dirigir o tráfico da proteína, sequências peptídicas curtas que facilitam a clonagem ou a purificação (por exemplo, compreendendo etiquetas de histidina ou seja, His_n em que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais), ou sequências que aumentam a estabilidade da proteína. Outras sequências de aminoácidos do C-terminal adequadas serão evidentes para os peritos na técnica.

Nas proteínas híbridas preferidas da invenção, uma das porções de X é uma sequência da "proteína 936". Por exemplo, onde $n = 2$, A = Met, X₁ é uma sequência 936 (por exemplo, SEQ ID N°: 76, que é a proteína MC58 processada), L₁ = um ligante de poli-glicina (por exemplo, SEQ ID N°: 144), X₂ = uma sequência NMB1870 em que o N-terminal foi eliminado até, e incluindo a sua própria sequência de poli-glicina, e L₂ e B podem ser omitidos. Um exemplo de uma tal proteína híbrida, é a SEQ ID N°: 77, em que NMB1870 truncada da estirpe m1239 é a jusante da 936 processada da estirpe MC58. Outros exemplos de proteínas híbridas de 936 (estirpe 2996) e NMB1870 truncada (estirpe 2996 ou M1239) são as SEQ ID N°s: 91, 92, 93 e 94.

Proteínas em tandem preferidas onde $n = 3$ pode ter todas as três variantes NMB 1870 em qualquer ordem:

X ₁	1	1	2	2	3	3
X ₂	2	3	1	3	1	2
X ₃	3	2	3	1	2	1

Proteínas em tandem preferidas onde $n = 2$ pode ter duas variantes NMB1870 diferentes:

X_1	1	1	2	2	3	3
X_2	2	3	1	3	1	2

Exemplos de proteínas em tandem, onde $n = 2$ (duas variantes NMB1870 diferentes) são das SEQ ID N°s: 79, 82, 83, 85, 87, 88, 89 e 90, que utilizam estirpes MC58 (variante 1), 2996 (variante 2) e M1239 (variante 3). Um exemplo de uma proteína em tandem, em que $n = 3$ é dada como a SEQ ID N°: 142.

Ácidos nucleicos

A invenção proporciona ácido nucleico que codifica uma proteína da invenção, tal como definido acima.

Os ácidos nucleicos da invenção podem ser usados em reações de hibridação (por exemplo, transferência de Northern ou Southern, ou em micromatrizes de ácido nucleico ou "chips de genes") e as reações de amplificação de PCR (por exemplo, SDA, SSSR, LCR, TMA, NASBA, etc.) e outras técnicas de ácidos nucleicos.

Os ácidos nucleicos da invenção podem ser preparados de várias *maneiras*, por exemplo, por síntese química, em todo ou em parte, por digestão de polinucleótidos mais longos utilizando nucleases (por exemplo, enzimas de restrição), a partir de bibliotecas genômicas ou de cADN, a partir da própria bactéria, etc.

Os ácidos nucleicos da invenção podem assumir várias formas, por exemplo, de cadeia simples, cadeia dupla, vetores, iniciadores, sondas, marcados, não marcados, etc.

Os ácidos nucleicos da invenção são de preferência, na forma isolada ou substancialmente isolada.

A invenção inclui o ácido nucleico compreendendo sequências complementares às descritas acima, por exemplo, por antessentido ou sondagem, ou para utilização como iniciadores.

O termo "ácido nucleico" inclui ADN e ARN, e também os seus análogos, tais como os que contêm estruturas modificadas, e também ácidos nucleicos peptídicos (PNA), etc.

O ácido nucleico de acordo com a invenção pode ser marcado, por exemplo com um marcador radioativo ou fluorescente. Isto é particularmente útil onde o ácido nucleico é para ser utilizada em técnicas de detecção de ácido nucleico, por exemplo, onde o ácido nucleico é um iniciador ou uma sonda para uso em técnicas tais como PCR, LCR, TMA, NASBA, etc.

A invenção também proporciona vectores compreendendo sequências de nucleótidos da invenção (por exemplo, vectores de clonagem ou de expressão, tais como os que são adequados para a imunização por um ácido nucleico) e células hospedeiras transformadas com tais vectores.

Outros componentes antigénicos

As composições da invenção incluem um pequeno número (por exemplo, menos de t antigénios, onde t é 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ou 3) de antigénios purificados do serogrupo B . É particularmente preferido que a composição

não deva conter misturas complexas ou indefinidas de antígenos, por exemplo, prefere-se não incluir vesículas de membrana externa na composição. Os antígenos são preferivelmente expressos de forma recombinante, num hospedeiro heterólogo e, em seguida, purificados.

A composição da invenção inclui pelo menos duas proteínas NMB1870 diferentes. Pode também incluir um outro antígeno de *Neisseria*, como uma vacina que tem como alvo mais do que um antígeno por bactéria, o que diminui a possibilidade de seleção de mutantes de escape. Antígenos *Neisseria* para inclusão nas composições incluem proteínas compreendendo:

(a), a 446 mesmo as SEQ IDs (ou seja, 2, 4, 6, ..., 890, 892) descrita na referência 6.

(b) a 45 mesmo as SEQ IDs (ou seja, 2, 4, 6, ..., 88, 90) descrita na referência 7;

(c) a 1674 mesmo as SEQ IDs 2-3020, mesmo as SEQ IDs 3040-3114, e todas as SEQ IDs 3115-3241, divulgadas na referência 8;

(d) as 2160 sequências de aminoácidos NMB0001 a NMB2160 da referência 2;

(e) uma sequência de aminoácidos revelada na referência 10, 11 ou 12;

(f) uma variante, homólogo, ortólogo, parólogo, mutante, etc. de (a) a (e); ou

(g) uma vesícula de membrana externa preparada de *N. meningitidis* [por exemplo, ver referência 139].

Em adição a antígenos de *Neisseria*, a composição pode incluir antígenos para imunizar contra outras doenças ou

infecções. Por exemplo, a composição pode incluir um ou mais dos seguintes antígenos adicionais:

- antígenos de *Helicobacter pylori* tais como CagA [18 a 21], VacA [22, 23], NAP [24, 25, 26], HopX [por exemplo, 27], HOPX [por exemplo, 27] e/ou urease.

- um antígeno de sacárido de *N. meningitidis* do serogrupo A, C, W135 e/ou Y, tal como o oligossacárido revelado na referência 28 do serogrupo C [ver também a referência 29] ou os oligossacarídeos da referência 30.

- um antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por exemplo, 31, 32, 33].

- um antígeno do vírus da hepatite A, tal como o vírus inativado [por exemplo, 34, 35].

- um antígeno do vírus da hepatite B, tais como, antígenos de superfície e/ou nucleares [por exemplo, 35, 36].

- um antígeno da difteria, tal como o toxóide da difteria [por exemplo, capítulo 3 da referência 37], por exemplo, o mutante CRM₁₉₇ [por exemplo, 38].

- um antígeno do tétano, tal como um toxóide do tétano [por exemplo, capítulo 4 da referência 37].

- um antígeno de *Bordetella pertussis*, tais como pertussis holotoxina (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente, também em combinação com pertactina e/ou aglutinogênios 2 e 3 [por exemplo, referências 39 e 40].

- um antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae B* [por exemplo, 29].

- um antígeno do vírus da hepatite C [por exemplo, 41].
- um antígeno a partir de *N. gonorrhoeae* [por exemplo, 6, 7, 8, 42].
- um antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por exemplo, referências 43-49].
- um antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por exemplo, 50].
- um antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por exemplo, 51].
- antígenos de poliomielite [por exemplo, 52, 53], tais como IPV.
- antígenos rábicos [por exemplo, 54], tais como vírus inativado liofilizado [por exemplo, 55, RabAvert™].
- antígenos do sarampo, papeira e/ou rubéola [por exemplo, capítulos 9, 10 e 11 da referência 37].
- antígenos da gripe [por exemplo, capítulo 19 da referência 37], tais como a hemaglutinina e/ou as proteínas de superfície da neuraminidase.
- um antígeno de *catarrhalis Moraxella* [por exemplo, 56].
- um antígeno de proteínas de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo do grupo B) [por exemplo, 57, 58].
- um antígeno de sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo do grupo B).
- um antígeno de *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus do grupo A) [por exemplo, 58, 59, 60].
- um antígeno de *Staphylococcus aureus* [por exemplo, 61].

- um antígeno de *Bacillus anthracis* [por exemplo, 62, 63, 64].
- um antígeno de um vírus da família Flaviviridae (género flavivírus), como o vírus da febre amarela, o vírus da encefalite japonesa, quatro sorotipos do vírus da dengue, vírus da encefalite da carraça, vírus do Nilo Ocidental.
- um antígeno pestivírus, como a partir do vírus da peste suína clássica, o vírus da diarreia viral bovina, e/ou vírus da doença de fronteira.
- um antígeno do parvovírus, por exemplo, a partir de parvovírus B19.
- uma proteína prião (por exemplo, a proteína prião CJD)
- uma proteína amilóide, tal como um péptido beta [65]
- um antígeno do cancro, tais como os listados na Tabela 1 da referência 66 ou nas Tabelas 3 & 4 da referência 67.

A composição pode compreender um ou mais destes outros antígenos.

Antígenos de proteína tóxica pode ser desintoxicados onde necessário (por exemplo, desintoxicação da toxina da tosse convulsa por meios químicos e/ou genéticos [40]).

Sempre que um antígeno da difteria é incluído na composição, é preferível incluir também o antígeno do tétano e antígenos da tosse convulsa. Similarmente, onde um antígeno do tétano é incluído, é preferível incluir também os antígenos da difteria e da tosse convulsa. Similarmente, onde um antígeno da tosse convulsa é incluído, é preferível incluir também os antígenos da difteria e do tétano. Combinações DTP são assim preferidas.

Antigénios sacarídeos são preferencialmente na forma de conjugados. Proteínas de transporte para os conjugados incluem a membrana externa da proteína *N. meningitidis* [68], peptídeos sintéticos [69,70], proteínas de choque térmico [71,72], proteínas da tosse convulsa [73,74], a proteína D de *H. influenzae* [75], citocinas [76], linfocinas [76], proteínas estreptococos, hormonas [76], fatores de crescimento [76], toxina A ou B de *C. difficile* [77], proteínas de ferro-absorção [78], etc. Uma proteína portadora preferida é o toxóide da difteria CRM197 [79].

Antigénios da composição estarão tipicamente presentes numa concentração de pelo menos 1 µg/ml cada. Em geral, a concentração de um determinado antigénio vai ser suficiente para induzir uma resposta imune contra esse antigénio.

As composições imunogénicas da invenção podem ser utilizadas terapêuticamente (ou seja, para tratar uma infeção já existente) ou profilaticamente (ou seja, para evitar uma infeção futura).

Como alternativa à utilização de proteínas de antigénios nas composições imunogénicas da invenção, o ácido nucleico (preferencialmente ADN, por exemplo, sob a forma de um plasmídeo) que codifica o antigénio pode ser utilizado.

As composições particularmente preferidas da invenção, incluem um, dois ou três de: (a) antigénios sacarídeos dos meningococos dos serogrupos Y, W135, C e (opcionalmente) A; (b) um antigénio de sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B; e/ou (c) um antigénio de *Streptococcus pneumoniae*.

Meningococos dos serogrupos Y, W135, C e (opcionalmente) A

As vacinas polissacarídicas contra os serogrupos A, C, W135 e Y são conhecidas há muitos anos. Estas vacinas (MENCEVAX ACWY™ e Menomune™) são à base de polissacáridos capsulares dos organismos e, embora sejam eficazes em adolescentes e adultos, proporcionam uma resposta imunitária pobre e curta duração da proteção, e não podem ser utilizadas em recém-nascidos.

Em contraste com os antígenos de polissacáridos não conjugados destas vacinas, as vacinas contra o serogrupo C recentemente aprovadas (Menjugate™ [80,28], Meningitec™ e NeisVac-C™) incluem sacarídeos conjugados. A Menjugate™ e Meningitec™ têm antígenos de oligossacarídeos conjugados com um transportador CRM₁₉₇, enquanto a NeisVac-C™ utiliza o polissacárido completo (des-O-acetilado) conjugado com um transportador toxóide tetânico. A vacina Menactra™ proposta contém antígenos sacarídeos capsulares conjugados de cada um dos serogrupos Y, W135, C e A.

As composições da presente invenção incluem, de preferência os antígenos sacarídeos capsulares de um ou mais dos serogrupos meningococos Y, W135, C e (opcionalmente) A, em que os antígenos são conjugados com a proteína transportadora e/ou são oligossacarídeos. Por exemplo, a composição pode incluir um antígeno capsular de sacarído: serogrupo C; serogrupos A e C; serogrupos A, C e W135; serogrupos A, C e Y; serogrupos C, W135 e Y, ou a partir de todos os quatro dos serogrupos A, C, W135 e Y.

Uma quantidade típica de cada antígeno sacarído meningocócico por dose situa-se entre 1 µg e 20 µg, por exemplo, cerca de 1 µg, cerca de 2,5 µg, cerca de 4 µg,

cerca de 5 µg, ou cerca de 10 µg (expresso como sacarídeos).

Quando uma mistura compreende sacarídeos capsulares de ambos os serogrupos A e C, a proporção (p/p) de sacarido MenA: sacarido MenC pode ser maior do que 1 (por exemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou superior). Quando uma mistura compreende sacarídeos capsulares do serogrupo Y e um ou ambos os serogrupos C e W135, a proporção (p/w) de sacarido MenY: sacarido MenW135 pode ser maior do que 1 (por exemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:01, 10:1 ou superior) e/ou a proporção (p/p) de sacarido MenY: sacarido MenC pode ser menor do que 1 (por exemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, ou inferior). Relações preferenciais (p/p) de sacarídeos dos serogrupos A:C:W135:Y são: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:02:01: 1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2 e 2:2:2:1. Relações preferenciais (p/p) de sacarídeos de serogrupos C:W135:Y são: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1 e 2:1:1. A utilização de uma massa substancialmente igual de cada sacarido é preferida.

Sacarídeos capsulares serão geralmente utilizados na forma de oligossacarídeos. Estes são convenientemente formados por fragmentação do polissacarídeo capsular purificado (por exemplo, por hidrólise), que será normalmente seguida de purificação dos fragmentos do tamanho desejado.

Fragmentação de polissacarídeos é preferencialmente realizada para dar um grau médio final de polimerização (DP) no oligossacarídeo de menos do que 30 (por exemplo, entre 10 e 20, de preferência cerca de 10 para o serogrupo A; entre 15 e 25 para os serogrupos W135 e Y, de preferência cerca de 15-20; entre 12 e 22 para o serogrupo C; etc.). DP pode ser convenientemente medido por

cromatografia de troca iônica ou por meio de ensaios colorimétricos [81].

Se a hidrólise é realizada, o hidrolisado irá geralmente ser dimensionado a fim de remover oligossacáridos de comprimento curto [29]. Isto pode ser conseguido de várias maneiras, tais como a ultrafiltração, seguido por cromatografia de troca iônica. Oligossacáridos com um grau de polimerização de menos do que ou igual a cerca de 6 são preferivelmente removidos para o serogrupo A, e os inferiores a cerca de 4 são preferivelmente removidos para os serogrupos W135 e Y.

Antigénios sacarídeos MenC preferidos são revelados na referência 80, como utilizados na Menjugate™.

O antigénio de sacárido pode ser quimicamente modificado. Isto é particularmente útil para reduzir a hidrólise para o serogrupo A [82; ver abaixo]. A -O-acetilação de sacarídeos meningocócicos pode ser realizada. Para oligossacarídeos, a modificação pode ocorrer antes ou depois de despolimerização.

Quando uma composição da invenção inclui um antigénio sacárido MenA, o antigénio é preferencialmente um sacárido modificado, no qual um ou mais dos grupos hidroxilo em que o sacárido nativo foi/foram substituídos por um grupo de bloqueio [82]. Esta modificação aumenta a resistência à hidrólise.

O número de unidades de monossacáridos contendo grupos de bloqueio pode variar. Por exemplo, todas ou substancialmente todas as unidades de monossacárido podem ter grupos de bloqueio. Alternativamente, pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das unidades de monossacáridos podem ter grupos de bloqueio. Pelo menos 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 unidades de monossacáridos podem ter grupos de bloqueio.

Da mesma forma, o número de grupos de bloqueio numa unidade de monossacáridos pode variar. Por exemplo, o número de grupos de bloqueio numa unidade de monossacáridos pode ser 1 ou 2. O grupo de bloqueio irá geralmente estar na posição 4 e/ou na posição 3 das unidades de monossacárido.

A unidade terminal de monossacáridos pode ou não ter um grupo de bloqueio em vez do seu hidroxilo nativo. É preferível reter um grupo hidroxilo anomérico livre numa unidade de monossacárido do terminal, a fim de fornecer um identificador para as reações posteriores (por exemplo de conjugação). Grupos hidroxilo anoméricos podem ser convertidos a grupos amino ($-\text{NH}_2$ ou $-\text{NH}-\text{E}$, em que E é um grupo protetor de azoto) por aminação redutiva (com, por exemplo, $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$), e pode então ser regenerado depois de outros grupos hidroxilo serem convertidos em grupos de bloqueio.

Grupos de bloqueio para substituir os grupos hidroxilo podem ser diretamente acessíveis através de uma reação de derivatização de um grupo hidroxilo, ou seja, substituindo o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo por outro grupo. Derivados adequados de grupos hidroxilo que atuam como grupos de bloqueio são, por exemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por exemplo, éteres sililo ou éteres alquilo) e acetais. Alguns exemplos específicos de tais grupos de bloqueio são alil, Aloc benzilo, BOM, t-butil, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, dicas, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Outros grupos de bloqueio que não são diretamente acessíveis e que substituem completamente o grupo hidroxilo incluem alquilo

C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ alquilo C₁₋₆, NR¹R² (R¹ e R² são definidos no parágrafo seguinte), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂ (alquilo C₁₋₆), CN, CF₃, CCl₃, etc. Os grupos de bloqueio preferidos são grupos removedores de eletrões.

Os grupos de bloqueio preferidos são da fórmula:-O-X-Y- ou -OR₃ em que: X é C (O), S (O) ou SO₂, Y é um alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ ou arilo C₅₋₁₂ alquilo C₁₋₆, cada um dos quais pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de F, Cl, Br, CO₂ H, CO₂ (alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃, ou Y é NR¹R², R¹ e R² são independentemente selecionados de H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ alquilo C₁₋₆, ou R¹ e R² podem ser reunidos para formar um grupo heteroclico saturado C₃₋₁₂; R³ é alquilo C₁₋₁₂ ou cicloalquilo C₃₋₁₂, cada um dos que pode ser opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados a partir de F, Cl, Br, CO₂ (alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃, ou R³ representa arilo C₅₋₁₂ ou arilo C₅₋₁₂ alquilo C₁₋₆, cada um dos quais pode ser opcionalmente substituído com 1, 2, 3, 4 ou 5 grupos selecionados de F, Cl, Br, CO₂ H, CO₂ (alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃. Quando R³ é alquilo C₁₋₁₂ ou cicloalquilo C₃₋₁₂, é tipicamente substituído com 1, 2 ou 3 grupos tal como acima definido. Quando R¹ e R² estão ligados para formar um grupo heteroclico saturado C₃₋₁₂, pretende-se dizer que R¹ e R² em conjunto com o átomo de azoto formam um grupo heterocíclico saturado, contendo qualquer número de átomos de carbono entre 3 e 12 (por exemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). O grupo heterocíclico pode conter um ou dois heteroátomos (tais como N, O ou S) para além do átomo de azoto. Exemplos de grupos heterocíclicos saturados C₃₋₁₂ são pirrolidinilo,

piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidínilo e aziridinilo.

Grupos de bloqueio $-O-X-Y$ e $-OR_3$ podem ser preparados a partir de grupos $-OH$ por meio de procedimentos de derivação padrão, tais como reação do grupo hidroxilo com um haleto de acilo, haleto de alquilo, haleto de sulfonilo, etc. Assim, o átomo de oxigénio em $-O-X-Y$ é preferencialmente o átomo de oxigénio do grupo hidroxilo, enquanto que o grupo $-X-Y$ em $-O-X-Y$ substitui de preferência o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo.

Alternativamente, os grupos de bloqueio podem ser acessíveis através de uma reação de substituição, tal como uma substituição de tipo Mitsunobu. Estes e outros métodos de preparação de grupos de bloqueio a partir de grupos de hidroxilo são bem conhecidos.

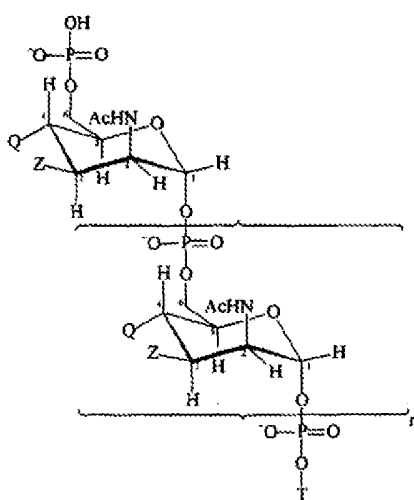
Mais preferencialmente, o grupo de bloqueio é $-OC(O)CF_3$ [83], ou um grupo carbamato $-OC(O)NR^1R^2$, onde R^1 e R^2 são independentemente selecionados de alquilo C_{1-6} . Mais preferencialmente, R^1 e R^2 são ambos metilo, ou seja, o grupo de bloqueio é $-OC(O)NMe_2$. Os grupos de bloqueio carbamato possuem um efeito estabilizante sobre a ligação glicosídica e podem ser preparados sob condições suaves.

Sacarídeos MenA modificados preferidos contêm unidades, em que, pelo menos, $\%h$ das unidades de monossacárido não têm grupos $-OH$ em ambas as posições 3 e 4. O valor de h é de 24 ou mais (por exemplo, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 ou 100) e é, de preferência 50 ou mais. Os grupos $-OH$ ausentes são preferencialmente grupos de bloqueio como acima definido.

Outros sacarídeos MenA modificados preferidos compreendem unidades de monossacárido, em que pelo menos s das unidades

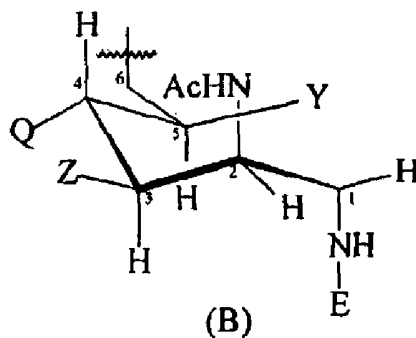
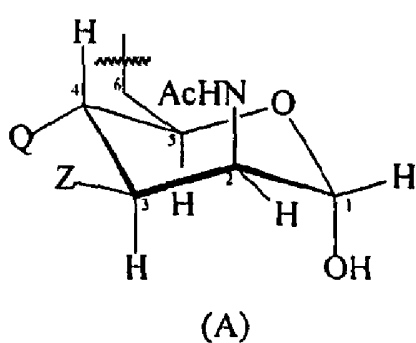
de monossacárido não têm -OH na posição 3 e não têm -OH na posição 4. O valor de s é pelo menos 1 (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90). Os grupos -OH ausentes são preferencialmente grupos de bloqueio como acima definido.

Sacarídeos adequados modificados MenA para uso com a invenção têm a fórmula:



em que n é um número inteiro de 1 a 100 (de preferência um número inteiro de 15 a 25);

T é da fórmula (A) ou (B):



cada grupo Z é selecionado de forma independente a partir de OH ou um grupo bloqueante tal como acima definido, e cada grupo Q é independentemente selecionado a partir de OH ou um grupo bloqueante tal como acima definido; Y é selecionado a partir de OH ou um grupo bloqueante tal como acima definido;

E é H ou um grupo protetor de azoto;

e em que mais do que cerca de 7% (por exemplo, 8%, 9%, 10% ou mais) dos grupos Q são grupos de bloqueio.

Cada um dos grupos Z $n+2$ pode ser igual ou diferente uns dos outros. Da mesma forma, cada um dos grupos Q $n+2$ pode ser o mesmo ou diferente um do outro. Todos os grupos Z podem ser OH. Alternativamente, pelo menos, 10%, 20, 30%, 40%, 50% ou 60% dos grupos Z podem ser OAc. De preferência, cerca de 70% dos grupos Z são OAc, com o restante dos grupos Z a ser OH ou grupos de bloqueio como acima definido. Pelo menos cerca de 7% dos grupos Q são grupos de bloqueio. De preferência, pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mesmo 100% dos grupos Q são grupos de bloqueio.

Polissacáridos capsulares meningocócicos são tipicamente preparados por um processo compreendendo os passos de precipitação de polissacarídeo (por exemplo, usando um detergente catiónico), fracionamento com etanol, extração de fenol a frio (para remover a proteína) e ultracentrifugação (para remover LPS) [por exemplo, referência 84]. Um processo mais preferido [30], contudo, envolve a precipitação de polissacarídeo seguido por solubilização do polissacarídeo precipitado utilizando um álcool inferior. A precipitação pode ser conseguida usando um detergente catiónico, tais como sais de tetrabutylamónio

e de cetiltrimetilamônio (por exemplo, os sais de brometo), ou brometo de hexadimetrina e sais de miristiltrimetilamônio. Brometo de cetiltrimetilamônio ('CTAB') é particularmente preferido [85]. A solubilização do precipitado pode ser conseguida utilizando um álcool inferior tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dióis, etc., mas o etanol é particularmente adequado para solubilizante de complexos de polissacarídeos CTAB. O etanol é preferencialmente adicionado ao polissacarídeo precipitado para dar uma concentração final (com base no teor total de etanol e água) de entre 50% e 95%.

Depois da re-solubilização, o polissacarídeo pode ser adicionalmente tratado para remover os contaminantes. Isto é particularmente importante em situações em que, mesmo a menor contaminação não é aceitável (por exemplo, para a produção de vacina humana). Isto vai tipicamente envolver um ou mais passos de filtração por exemplo, filtração profunda, filtração através de carvão ativado pode ser utilizado, filtração de tamanho e/ou ultrafiltração. Depois de filtrado para remover os contaminantes, o polissacarídeo pode ser precipitado para tratamento posterior e/ou de processamento. Isto pode ser convenientemente alcançado por meio da troca catiões (por exemplo, através da adição de sais de cálcio ou de sódio).

Como uma alternativa à purificação, os sacáridos capsulares da presente invenção podem ser obtidos por síntese, por exemplo, total ou parcial, a síntese Hib é divulgada na referência 86, a síntese MenA, na referência 87.

As composições da invenção compreendem os sacáridos capsulares de pelo menos dois serogrupos de *N. meningitidis*. Os sacarídeos são preferencialmente

preparados separadamente (incluindo qualquer fragmentação, conjugação, modificação, etc.) e, em seguida, misturados para se obter uma composição da invenção.

Quando a composição compreende o sacárido capsular do serogrupo A, no entanto, é preferível que o sacárido do serogrupo A não seja combinado com o outro sacárido um pouco antes da utilização, a fim de minimizar o potencial para a hidrólise. Isto pode convenientemente ser conseguido tendo o componente do serogrupo A (normalmente em conjunto com excipientes apropriados) na forma liofilizada e o outro componente do serogrupo na forma líquida (também com excipientes adequados), com os componentes líquidos a serem utilizados para reconstituir o componente MenA liofilizado, quando pronto para utilização. Quando um adjuvante de sal de alumínio é utilizado, é preferível incluir o adjuvante no frasco contendo a vacina com o líquido, e para liofilizar o componente MenA sem adjuvante.

Uma composição da invenção pode, assim, ser preparada a partir de um kit que compreende: (a) sacárido capsular de *N. meningitidis* do serogrupo A, na forma liofilizada; e (b) os restantes antigénios a partir da composição, em forma líquida. A invenção também fornece um método para a preparação de uma composição da invenção, compreendendo a mistura de um sacárido capsular liofilizado a partir de *N. meningitidis* do serogrupo A, com os restantes antigénios, em que os referidos outros antigénios estão numa forma líquida.

Dentro de cada dose, a quantidade de um antigénio de sacarídeo particular será, geralmente, entre 1-50 µg (medida como massa de sacárido), com cerca de 2,5 µg, 5 µg ou 10 µg de cada um sendo preferido. Com A:C:W135:Y proporções de peso de 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1;

8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; 2:2:2:1 e, por conseguinte, a quantidade representada pelo número 1 é de preferência cerca de 2,5 µg, 5 µg ou 10 µg. Para uma proporção de 1:1:1:1 A:C:W:Y e uma composição de 10 µg por sacárido, por conseguinte, de 40 µg de sacarídeo são administradas por dose. As composições preferidas têm a seguinte µg de sacarídeos por dose:

A	10	0	0	0	10	5	2.5
C	10	10	5	2.5	5	5	2.5
W135	10	10	5	2.5	5	5	2.5
Y	10	10	5	2.5	5	5	2.5

As composições preferidas da presente invenção compreendem menos de 50 µg por dose de sacárido meningocócico. Outras composições preferidas compreendem $\leq$ 40 µg sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem $\leq$ 30 µg sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem $\leq$ 25 µg de sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem $\leq$ 20 µg de sacárido meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem $\leq$ 10 µg de sacárido meningocócico, por dose, mas, de preferência, as composições da invenção compreendem, pelo menos, 10 µg por dose de sacárido meningocócico.

Os conjugados Menjugate™ e NeisVac™ MenC utilizam um adjuvante de hidróxido, enquanto Meningitec™ utiliza um fosfato. É possível, em composições da invenção adsorver alguns antigénios de um hidróxido de alumínio, mas ter outros antigénios em associação com um fosfato de alumínio.

Para combinações do serogrupo tetravalente, por exemplo, as seguintes permutações estão disponíveis:

Serogroup	Aluminium salt (H = a hydroxide; P = a phosphate)															
A	P	H	p	H	H	H	P	P	p	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Para combinações trivalentes do serogrupo de *N. meningitidis*, os seguintes permutações estão disponíveis:

Serogroup	Aluminium salt (H = a hydroxide; P = a phosphate)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

Haemophilus influenzae tipo B

Quando a composição inclui um antígeno de *H. influenzae* tipo B, que será tipicamente um antígeno sacárido capsular Hib. Antígenos sacarídeos de *H. influenzae* b são bem conhecidos.

Com vantagem, o sacárido Hib é conjugado de forma covalente a uma proteína transportadora, a fim de aumentar a sua imunogenicidade, especialmente em crianças. A preparação de conjugados de polissacáridos, em geral, e de polissacarídeo capsulares Hib em particular, é bem documentada [por exemplo, referência 88-96 etc.]. A invenção pode utilizar qualquer conjugado Hib adequado. Proteínas transportadoras adequadas são descritas abaixo, e os veículos preferidos para os sacarídeos Hib são CRM₁₉₇ ('HbOC'), toxóide tetânico

('PRP-T') e o complexo de membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

A porção de sacárido do conjugado pode ser um polissacarídeo (por exemplo, de comprimento total do fosfato de poliribosilribitol (PRP)), mas prefere-se hidrolisar polissacáridos para formar oligossacarídeos (por exemplo, MW de ~ 1 a -5 kDa).

Um conjugado preferido compreende um oligossacarídeo Hib ligado covalentemente a CRM₁₉₇ por meio de um ligante de ácido adípico [97, 98]. O toxóide do tétano é também um veículo preferido.

As composições da invenção podem compreender mais do que um antigénio Hib.

Quando uma composição inclui um antigénio sacárido Hib, é preferível que não inclua também um adjuvante de hidróxido de alumínio. Se a composição inclui um adjuvante de fosfato de alumínio, em seguida, o antigénio Hib pode ser adsorvido ao adjuvante [99] ou pode ser não-adsorvido [100].

Antigénios Hib podem ser liofilizados, por exemplo em conjunto com antigénios de meningococos.

Streptococcus pneumoniae

Quando a composição inclui um antigénio de *S. pneumoniae*, que normalmente será um antigénio de sacárido capsular, é, de preferência conjugado com uma proteína transportadora [por exemplo. referências 31-33]. É preferível incluir sacáridos de mais de um sorotipo de *S. pneumoniae*. Por exemplo, misturas de polissacáridos de 23 serotipos diferentes são largamente utilizados, como são vacinas conjugadas com polissacarídeos de entre 5 e 11 serotipos

diferentes [101]. Por exemplo, Prevnar™ [102] contém antígenos de sete sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F) com cada sacárido conjugado individualmente a CRM₁₉₇ por aminação redutora, com 2 µg de cada sacárido por dose de 0,5 ml (4 µg do sorotipo 6B), e com conjugados adsorvidos sobre um adjuvante de fosfato de alumínio. As composições da invenção incluem, de preferência, pelo menos os sorotipos 6B, 14, 19F e 23F. Os conjugados podem ser adsorvidos sobre um fosfato de alumínio.

Como alternativa à utilização de antígenos sacarídeos de pneumococo, a composição pode incluir um ou mais antígenos polipeptídicos. Sequências do genoma de várias estirpes de pneumococos estão disponíveis [103,104] e podem ser submetidas para inverter a vacinologia [105-108] para identificar antígenos polipeptídicos adequados [109,110]. Por exemplo, a composição pode incluir um ou mais dos seguintes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SPSA, LytB, LytC, LytA, SP125, SP101, SP128 e SP130, conforme definido na referência 111.

Em algumas formas de realização, a composição pode incluir tanto antígenos sacarídeos como polipeptídicos de pneumococo. Estes podem ser utilizados em mistura simples, ou o antígeno sacarídeo de pneumococos pode ser conjugado com uma proteína pneumocócica. Proteínas veiculares apropriadas para tais formas de realização incluem os antígenos listados no parágrafo anterior [111].

Antígenos pneumocócicos podem ser liofilizado por exemplo, juntamente com antígenos meningocócicos e/ou Hib.

Conjugação covalente

Sacarídeos capsulares em composições da invenção irão geralmente ser conjugados com a proteína transportadora. Em

geral, a conjugação aumenta a imunogenicidade dos sacarídeos na medida em que os converte a partir de antigénios T independentes a antigénios dependentes de T, permitindo assim a iniciação da memória imunológica. A conjugação é particularmente útil para as vacinas pediátricas e é uma técnica bem conhecida [por exemplo, revista nas referências 112 e 88-96].

Proteínas de transporte preferidas são toxinas ou toxóides bacterianos, tais como o toxóide da difteria ou o toxóide tetânico. O CRM₁₉₇ da toxina da difteria mutante [79113114] é particularmente preferido. Outras proteínas transportadoras adequadas incluem a proteína da membrana externa de *N. meningitidis* [68], péptidos sintéticos [69,70], proteínas de choque térmico [71,72], proteínas de tosse convulsa [73,74], citocinas [76], linfocinas [76], hormonas [76], fatores de crescimento [76], proteínas artificiais compreendendo múltiplos epítomos de células T CD4⁺ humanas de diversos antigénios derivados de agentes patogénicos [115], proteína D de *H. influenzae* [75, 116], proteína de superfície pneumocócica PspA [117], proteínas de ferro-captção [78], toxina A ou B de *C. difficile* [77], etc. Os veículos preferidos são o toxóide diftérico, toxóide tetânico, proteína D de *H. influenzae*, e CRM₁₉₇.

Dentro de uma composição da invenção, é possível utilizar mais do que uma proteína transportadora, por exemplo, para reduzir o risco de supressão transportadora. Assim, diferentes proteínas de transporte podem ser utilizadas para diferentes serogrupos, por exemplo, sacáridos do serogrupo A poderiam ser conjugados com CRM₁₉₇, enquanto os sacáridos do serogrupo C podem ser conjugados com o toxóide do tétano. Também é possível usar mais do que uma proteína transportadora para um sacárido, por exemplo, o antigénio de sacarídeos específicos do serogrupo A pode estar em dois

grupos, com alguns conjugados com CRM₁₉₇ e outros conjugados com o toxóide do tétano. Em geral, no entanto, prefere-se usar a mesma proteína transportadora para todos os sacarídeos.

A proteína transportadora única pode levar mais de um antígeno de sacarídeo [118]. Por exemplo, uma única proteína transportadora pode ter conjugada a ela sacarídeos dos serogrupos A e C. Para atingir este objetivo, os sacáridos podem ser misturados antes da reação de conjugação. Em geral, no entanto, prefere ter-se conjugados separados para cada serogrupo.

Os conjugados com um sacárido: proteína (p/p) de entre 1:5 (isto é, o excesso de proteína) e 5:1 (isto é, o excesso de sacárido) são preferidos. São preferidos rácios 1:2-5:1, enquanto as razões entre 1:1,25 e 1:2,5 são os mais preferidos. O excesso de proteína transportadora é preferido para MenA e MenC.

Os conjugados podem ser utilizados em conjunto com a proteína transportadora livre [119]. Quando uma dada proteína transportadora está presente tanto na forma livre e conjugada numa composição da invenção, a forma não conjugada é de preferência não mais do que 5% da quantidade total de proteína veículo na composição, como um todo, e mais preferencialmente presente menos do que 2% em peso.

Qualquer reação de conjugação adequada pode ser usada, com qualquer ligante adequado, quando necessário.

O sacárido será tipicamente ativado ou funcionalizado antes da conjugação. A ativação pode envolver, por exemplo, reagentes cianilizadores tais como CDAP (por exemplo, 1-ciano-4-dimetilamino piridina tetrafluorborato [120,121, etc]). Outras técnicas adequadas usam carbodiimidas,

hidrazidas, esteres ativos, norborane, ácido p-nitrobenzóico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; ver também a introdução da referência 94).

Ligações através de um grupo ligante podem ser feitas utilizando qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos descritos nas referências 122 e 123. Um tipo de ligação envolve a aminação redutora do polissacárido, acoplando o grupo amino resultante com uma extremidade de um grupo ligante de ácido adípico, e em seguida o acoplamento de uma proteína para a outra extremidade do grupo ligante de ácido adípico [92, 124, 125]. Outros ligantes incluem B-propionamido [126], nitrofenil-etilamina [127], haletos de haloacilo [128], ligações glicosídicas, [129], ácido 6-aminocapróico [130], ADH [131], unidades C₄ a C₁₂ [132] etc. Como uma alternativa à utilização de um ligante, a ligação direta pode ser usada. Ligações diretas à proteína podem compreender a oxidação do polissacárido seguido por aaminação redutiva com a proteína, tal como descrito em, por exemplo, as referências 133 e 134.

Um processo que envolve a introdução de grupos de aminoácidos em que o sacárido (por exemplo, substituindo os grupos terminais = O com -NH₂) seguida por derivatização com um diéster de ácido adípico (por exemplo, ácido adípico diéster N-hidroxisuccinimido) e de reação com a proteína transportadora é preferido. Outra reação preferida usa a ativação CDAP com uma transportadora, por exemplo, proteína D para MenA ou MenC.

Após a conjugação, sacarídeos livres e conjugados podem ser separados. Existem muitos métodos adequados, incluindo cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração, etc. [Ver também as referências 135 e 136, etc.]

Quando a composição da invenção inclui um conjugado de oligossacárido, é preferido que a preparação de oligossacárido precede a conjugação.

Vesículas de membrana externa

É preferível que as composições da invenção não devem incluir misturas complexas ou indefinidas de antigénios, que são características típicas de OMVs. No entanto, uma forma na qual a invenção pode ser aplicada para as OMVs é onde as OMVs estão a ser administradas num esquema de dose múltipla.

Onde mais do que uma dose OMV é para ser administrada, cada dose pode ser complementada (pela adição da proteína purificada ou por expressão da proteína dentro das bactérias a partir da qual as OMVs são derivadas) por uma da primeira proteína, segunda proteína ou terceira proteína, tal como definido acima. De preferência doses diferentes são complementadas com diferentes variantes NMB1870. Num calendário de OMV de três doses, por exemplo, cada dose pode conter uma proteína diferente da primeira proteína, segunda e terceira proteína de tal modo que, depois de receber três doses de OMVs, todas as três variantes foram recebidas. Num calendário de OMV de duas doses, uma variante pode ser utilizada por dose OMV (omitindo, assim, uma variante), ou uma ou ambas as doses de OMV poderia ser complementada com mais de uma variante, a fim de se obter uma cobertura com todas as três variantes. Em formas de realização preferidas, existem três doses de OMV, e cada uma das três doses de OMV contém três diferentes populações de vesículas por manipulação genética, cada uma exibindo três subtipos, dando assim nove subtipos diferentes no total.

Esta abordagem pode ser utilizada em geral para melhorar as preparações de microvesículas de *N. meningitidis* do serogrupo B [137], 'OMVs nativas' [138], bolhas ou vesículas de membrana externa [por exemplo, referências 139-144, etc]. Estes podem ser preparados a partir de bactérias que foram geneticamente manipuladas [145-148], por exemplo, para aumentar a imunogenicidade (imunogénios por exemplo, hiper-expressos), para reduzir a toxicidade, para inibir a síntese de polissacarídeo capsular, para infra-regular a expressão de PorA, etc. Podem ser preparados a partir de estirpes híper-bolhosas [149-152]. As vesículas de uma *Neisseria* não patogénicas podem ser incluídas [153]. As OMVs podem ser preparadas sem a utilização de detergentes [154,155]. Podem expressar proteínas não *Neisseria* na sua superfície [156]. Podem ser empobrecidas em LPS. Podem ser misturados com antigénios recombinantes [139,157]. As vesículas de bactérias com subtipos de proteína de membrana externa da classe I diferente podem ser usadas, por exemplo, seis subtipos diferentes [158,159] usando duas populações de vesículas geneticamente modificadas diferentes, cada um exibindo três subtipos, ou nove subtipos diferentes, utilizando três populações de vesículas geneticamente modificadas diferentes, cada um exibindo três subtipos, etc. Subtipos úteis incluem: P1.7.16; P1.5-1.2-2; P1.19.15-1; P1.5-2.10; P1.12-1.13; P1.7-2.4; P1.22.14; P1.7-1.1; P1.18-1.3,6.

Também é possível, é claro, complementar as preparações de vesículas com dois ou três variantes diferentes.

Imunização

A composição da invenção é preferivelmente uma composição imunogénica, e a invenção proporciona uma composição

imunogénica da invenção para utilização como um medicamento.

A invenção é útil num método para aumentar uma resposta de anticorpos num mamífero, compreendendo a administração de uma composição imunogénica da invenção ao mamífero. A resposta de anticorpos é de preferência uma resposta protetora e/ou bactericida do anticorpo.

A invenção é útil num método para proteger um mamífero contra uma infeção de *Neisseria* (por exemplo, meningocócica), compreendendo a administração ao mamífero de uma composição imunogénica da invenção.

A invenção também proporciona a utilização de pelo menos dois antigénios de (a) e (b) como definido acima no fabrico de um medicamento para a prevenção da infeção de *Neisseria* (por exemplo, meningocócica) num mamífero.

O mamífero é preferencialmente um ser humano. O ser humano pode ser um adulto ou, preferencialmente, uma criança.

As composições imunogénicas da invenção podem ser utilizadas terapeuticamente (ou seja, para tratar uma infeção já existente) ou profilaticamente (ou seja, para evitar uma futura infeção).

As utilizações e métodos são particularmente úteis para a prevenção/tratamento de doenças incluindo, mas não limitado a, meningite (meningite bacteriana em particular) e bacteremia.

A eficácia do tratamento terapêutico pode ser testada pela monitorização da infeção *Neisseria* após a administração da composição da invenção. A eficácia do tratamento profilático pode ser testada pela monitorização das

respostas imunes contra NMB1870 após a administração da composição. A imunogenicidade de composições da invenção pode ser determinada administrando-as para testar indivíduos (por exemplo, crianças. 12-16 meses de idade ou modelos animais [160]) e, em seguida, determinar os parâmetros usuais, incluindo anticorpos bactericidas do soro (SBA) e títulos ELISA (GMT) e de alta avidéz de anti-cápsula de IgG total. Estas respostas imunes será geralmente determinadas de cerca de 4 semanas após a administração da composição, e em comparação com os valores determinados antes da administração da composição. É preferido um aumento de SBA pelo menos 4 vezes ou 8 vezes. Quando mais de uma dose da composição é administrada, mais do que uma determinação pós-administração pode ser feita.

As composições preferidas da presente invenção podem conferir um título de anticorpos num paciente, que é superior ao critério de seroproteção para cada componente antigénico para uma percentagem aceitável de sujeitos humanos. Antígenos com um título de anticorpo associado acima do qual um hospedeiro considerado para ser seroconvertido contra o antigénio são bem conhecidos, e tais títulos são publicados por organizações como a OMS. De preferência mais do que 80% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos se seroconverteram, mais preferencialmente mais do que 90%, ainda mais preferencialmente mais do que 93% e mais preferencialmente 96-100%.

As composições da invenção serão geralmente administradas diretamente a um paciente. A entrega direta pode ser conseguida por injeção parentérica (por exemplo, por via subcutânea, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via intramuscular, ou para o espaço intersticial de um tecido), ou por administração rectal, oral, vaginal,

tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar ou outra mucosa. Administração por via intramuscular na coxa ou do braço é o preferido. A injeção pode ser feita através de uma agulha (por exemplo, uma agulha hipodérmica.), mas injeção sem agulha pode ser usado em alternativa. Uma dose típica é de 0,5 ml por via intramuscular.

A invenção pode ser utilizada para induzir a imunidade sistémica e/ou das mucosas.

O tratamento por dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de múltiplas doses. Doses múltiplas podem ser usadas num esquema de imunização primária e/ou num esquema de imunização de reforço. Um esquema de dose primária pode ser seguido por um programa de dose de reforço. O tempo adequado entre as doses penetrantes (por exemplo, entre 4-16 semanas), e entre dose inicial e reforço pode ser rotineiramente determinada.

A composição imunogénica da invenção incluirá geralmente um transportador farmacologicamente aceitável, o qual pode ser qualquer substância que não induza ela própria a produção de anticorpos prejudiciais para o paciente que recebe a composição e que podem ser administrados sem toxicidade indevida. Os veículos apropriados podem ser grandes macromoléculas, lentamente metabolizadas, tais como proteínas, polissacarídeos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, e partículas de vírus inativos. Tais transportadores são bem conhecidos dos peritos na técnica. Os veículos farmacologicamente aceitáveis podem incluir líquidos, tais como água, soro fisiológico, glicerol e etanol. Substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, substâncias tamponantes de pH e

semelhantes, podem também estar presentes em tais veículos. Os lipossomas são veículos adequados. Uma discussão completa de excipientes farmacêuticos está disponível na referência 161.

Infeções de *Neisseria* afetam várias áreas do corpo, e assim as composições da invenção podem ser preparados de várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injetáveis, quer como soluções líquidas ou suspensões. Formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em, veículos líquidos antes da injeção podem também ser preparadas. A composição pode ser preparada para administração tópica, por exemplo, como uma pomada, creme ou pó. A composição é preparada para administração oral, por exemplo como um comprimido ou cápsula, ou como um xarope (opcionalmente aromatizado). A composição pode ser preparada para administração pulmonar, por exemplo, como um inalador, utilizando um pó fino ou um spray. A composição pode ser preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, aural ou ocular, por exemplo, a administração na forma de gotas.

A composição é de preferência estéril. É preferencialmente livre de pirogénios. É, de preferência tamponada, por exemplo, entre pH 6 e pH 8, geralmente por volta de pH 7. Onde uma composição compreende um sal de hidróxido de alumínio, é preferível utilizar um tampão de histidina [162]. As composições da invenção podem ser isotónicas no que diz respeito aos seres humanos.

As composições imunogénicas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de imunogénio, assim como qualquer outra de outros componentes especificados, conforme necessário. Por "quantidade imunologicamente eficaz"

pretende-se dizer que a administração dessa quantidade a um indivíduo, quer numa dose única ou como parte de uma série, é eficaz para tratamento ou prevenção. Esta quantidade varia dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, idade, grupo taxonómico do indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não-humano, primata, etc.), a capacidade do sistema imunitário do indivíduo para sintetizar anticorpos, o grau de proteção desejado, a formulação da vacina, a avaliação do médico assistente da situação médica, e outros fatores relevantes. Espera-se que a quantidade irá cair numa gama relativamente ampla que pode ser determinada através de ensaios de rotina. O tratamento por dosagem pode ser um programa de dose única ou um plano de dose múltipla (por exemplo, incluindo doses de reforço). A composição pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunorreguladores.

Uma composição imunogénica irá geralmente incluir um adjuvante. Os adjuvantes preferidos para aumentar a eficácia da composição incluem, mas não estão limitados a: (A) MF59 (5% de esqualeno, 0.5% de Tween 80, e 0,5% de Span 85, formulado em partículas submicrónicas usando um microfluidificador) [ver Capítulo 10 da referência 163, ver também a referência 164]; (B) micropartículas (isto é, uma partícula de ~ 100nm a ~ 150 um de diâmetro, mais de preferência, de 200 nm a ~ 30 um de diâmetro, e mais preferencialmente a 500 nm a ~ 10 um de diâmetro) formadas a partir de materiais que são biodegradáveis e não-tóxicos (por exemplo, um poli (ácido hidroxialfa), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, etc.), com poli (lactido-co-glicolido), sendo preferível ('PLG'), opcionalmente tendo uma superfície carregada (por exemplo, adicionando um detergente catiónico, aniónico, ou não-iónico, como SDS

(negativo) ou CTAB (positivo) [por exemplo, referências 165 e 166.]; (C) lipossomas [ver Capítulos 13 e 14 da referência 163]; (D) ISCOMs [ver capítulo 23 da referência 163], e que pode ser desprovido de detergente adicional [167]; (E) SAF, contendo 10% de esqualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero plurônico em bloco L121 e thr-MDP, quer microfluidizado numa emulsão submicrônica ou vórtice para gerar um maior tamanho das partículas da emulsão [ver capítulo 12 da referência 163]; (F) sistema adjuvante (RAS) Ribi™, (Ribi Immunochem) contendo 2% de esqualeno, 0,2% de Tween 80, e um ou mais componentes da parede celular bacteriana a partir do grupo que consiste em monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM) e estrutura da parede celular (CWS), preferencialmente MPL + CWS (Detox™); (G) adjuvantes saponina, como QuilA ou QS21 [ver Capítulo 22 da referência 163], também conhecido como Stimulon™; (H) quitosano [por exemplo, 168]; (I) adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante incompleto de Freund (IFA); (J) citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferões (por exemplo, interferão- γ), fator de estimulação de colônias de macrófagos, fator de necrose tumoral, etc. [ver capítulos 27 e 28 da referência 163], RC529; (K) uma saponina (por exemplo, QS21.) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um esterol) [169]; (L) monofosforil-lípido A (MPL) ou 3-O-desacilado MPL (3dMPL) [por exemplo, capítulo 21 da referência 163]; (M) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões de óleo-em-água [170]; (N) oligonucleídeos compreendendo motivos CpG [171], ou seja, contendo pelo menos um dinucleotídeo CG, com 5-metilcitosina opcionalmente, ser utilizadas em vez de citosina; (O) um éter de polioxietileno ou um éter de polioxietileno [172]; (P) um agente tensioativo de éster de polioxietileno de sorbitano em combinação com um octoxinol

[173] ou um alquil éter de polioxietileno ou éster tensioativo em combinação com pelo menos um tensioativo não iônico adicional, tal como um octoxinol [174]; (Q) um oligonucleído imunoestimulador (por exemplo, um oligonucleótido CpG) e uma saponina [175]; (R) um imunoestimulante e uma partícula de sal de metal [176]; (S) uma saponina e uma emulsão de óleo-em-água [177]; (T) enterotoxina de lábil ao calor de *E. coli* ("LT"), ou os seus mutantes destoxificados, tais como os mutantes K63 ou R72 [por exemplo, Capítulo 5 da referência 38]; (U) toxina da cólera ("TC"), ou mutantes destoxificados da mesma [por exemplo, Capítulo 5 da referência 38]; (V) ARN de cadeia dupla; (W) sais de alumínio, tais como hidróxidos de alumínio (incluindo oxihidróxidos), fosfatos de alumínio (incluindo hidroxifosfatos), sulfato de alumínio, etc. [Capítulos 8 e 9 na referência 163] ou sais de cálcio, tais como fosfato de cálcio; e (X) outras substâncias que agem como agentes imunoestimulantes para reforçar a eficácia da composição [por exemplo. consulte o Capítulo 7 da referência 163]. Sais de alumínio (fosfatos de alumínio e, em particular hidroxifosfatos e/ou hidróxidos e particularmente oxi-hidróxido) e MF59 são os adjuvantes preferidos para a imunização parentérica. Os mutantes da toxina são adjuvantes preferidos de mucosa. QS21 é outro adjuvante útil para NMB1870, o qual pode ser usado isoladamente ou em combinação com qualquer um de (A) a (X), por exemplo, com um sal de alumínio. As composições de acordo com a reivindicação 1 incluem um adjuvante de sal de alumínio. Péptidos de muramil incluem N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicerol-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc.

Expressão de proteínas

Técnicas de expressão bacteriana são conhecidas na técnica. Um promotor bacteriano é qualquer sequência de ADN capaz de se ligar à polimerase de ARN bacteriana e iniciar a jusante (3') de uma sequência codificante (por exemplo, um gene estrutural), em mRNA. Um promotor terá uma região de iniciação da transcrição que está normalmente situada próximo da extremidade 5' da sequência de codificação. Esta região de iniciação da transcrição normalmente inclui um local de ligação da polimerase de ARN e um local de iniciação da transcrição. Um promotor bacteriano pode também ter um segundo domínio designado por operador, que poderá sobrepor-se um local de ligação da polimerase de ARN adjacente no qual a síntese de ARN começa. O operador permite a regulação (indutível) negativa da transcrição, como uma proteína repressora do gene pode ligar-se ao operador e deste modo inibir a transcrição de um gene específico. A expressão constitutiva pode ocorrer na ausência de elementos reguladores negativos, como o operador. Além disso, a regulação positiva pode ser conseguida por uma sequência de ligação da proteína ativadora de gene, que, se presente é normalmente proximal (5') à sequência de ligação da polimerase de ARN. Um exemplo de uma proteína ativadora de gene é a proteína ativadora de catabolitos (CAP), que ajuda a iniciar a transcrição do operão lac em *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud *et al.* (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18: 173]. A expressão regulada pode, portanto, ser positiva ou negativa, desse modo aumentando ou diminuindo a transcrição.

As sequências que codificam enzimas da via metabólica proporcionam sequências promotoras particularmente úteis. Exemplos incluem sequências promotoras derivadas de enzimas

metabolizadoras de açúcar, tais como galactose, lactose (*lac*) [Chang et al. (1977) *Nature* 198:1056], e maltose. Exemplos adicionais incluem sequências promotoras derivadas de enzimas biossintéticas, tais como triptofano (*trp*) [Goeddel et al. (1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelverton et al. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9:731; Patente US 4738921; EP 0036776 e EP 0121775]. O sistema β -lactamase (*bla*), o promotor [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." *Em interferon 3* (ed. I. Gresser)], bacteriófago lambda PL [Shimatake et al. (1981) *Nature* 292:128] e T5 [Patente US 4689406]. Sistemas promotores também fornecem sequências promotoras úteis. Outro promotor de interesse é um promotor induzível de arabinose (pBAD).

Além disso, os promotores sintéticos que não ocorrem na natureza também funcionam como promotores bacterianos. Por exemplo, sequências de ativação de transcrição de um promotor bacteriano ou de bacteriófago podem ser unidas com as sequências de operação de outro promotor bacteriano ou de bacteriófago, criando um promotor híbrido sintético [Patente US 4551433]. Por exemplo, o promotor *lac* é um promotor *trp-lac* híbrido composto de ambos os promotores *trp* e sequências operon *lac* que são reguladas pelo repressor *lac* [Amann et al. (1983) *Gene* 25:167; de Boer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad.* 80:21]. Além disso, um promotor bacteriano pode incluir promotores que ocorrem naturalmente de origem não bacteriana que têm a capacidade de se ligar à polimerase de ARN bacteriana e iniciar a transcrição. Um promotor que ocorre naturalmente de origem não bacteriana também pode ser acoplado com uma polimerase de ARN compatível para produzir elevados níveis de expressão de alguns genes em procariotas. O sistema polimerase de ARN/promotor do bacteriófago T7 é um exemplo de um sistema promotor acoplado [Studier et al. (1986) *J.*

Mol. Biol. 189:113; Tabor et al. (1985) Proc Natl. Acad. Sci. 82:1074]. Além disso, um promotor híbrido pode também ser compreendido por um promotor bacteriófago e uma região do operador de *E. coli* (EP 267 851).

Além de uma sequência promotora funcional, um local de ligação ao ribossoma eficiente é também útil para a expressão de genes estranhos em procariotas. Em *E. coli*, o local de ligação ao ribossoma é chamado de sequência de Shine-Dalgarno (SD) e inclui um codão de iniciação (ATG) e uma sequência de 3-9 nucleótidos de comprimento localizada 3-11 nucleótidos a montante do codão de iniciação [Shine et al. (1975) Nature 254:34]. A sequência SD é pensada para promover a ligação do mRNA ribossoma através do emparelhamento de bases entre a sequência SD e a extremidade 3' de *E. coli* 16S rARN, Steitz et al. (1979) "Genetic Signals and nucleotide sequences in Messenger RNA" em Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. RF Goldberger)]. Para expressar genes eucarióticos e genes procarióticos com fraca ligação do ribossoma local [Sambrook et al. (1989) "Expression of cloned genes in Escherichia coli." em Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Uma sequência promotora pode ser diretamente ligada com a molécula de ADN, caso em que o primeiro aminoácido no N-terminal será sempre uma metionina, que é codificada pelo codão de iniciação ATG. Se desejado, a metionina no N-terminal pode ser clivada a partir da proteína por incubação *in vitro* com brometo de cianogénio ou por incubação *in vivo* ou *in vitro* com uma peptidase de metionina N-terminal bacteriana (EP 0219237).

Normalmente, as sequências de terminação da transcrição reconhecidas por bactérias são regiões reguladoras

localizadas a 3'do codão de paragem da tradução, e assim juntamente com o flanco promotor da sequência de codificação. Estas sequências dirigem a transcrição de um mARN que pode ser traduzido no polipéptido codificado pelo ADN. As sequências de terminação da transcrição incluem frequentemente sequências de ADN de cerca de 50 nucleótidos capazes de formarem estruturas em laço estaminais que auxiliam na terminação da transcrição. Exemplos incluem sequências de terminação da transcrição derivadas de genes com promotores fortes, tais como o gene *trp* em *E. coli*, bem como outros genes biossintéticos.

Normalmente, os componentes acima descritos, compreendendo um promotor, sequência de sinal (se desejado), sequência codificante de interesse, e sequência de terminação da transcrição, são colocados em conjunto em construções de expressão. As construções de expressão são muitas vezes mantidas num replicão, tal como um elemento extracromossómico (por exemplo, plasmídeos) capazes de manutenção estável num hospedeiro, tal como as bactérias. O replicão terá um sistema de replicação, permitindo-lhe assim ser mantido num hospedeiro procariota, quer para expressão ou para clonagem e amplificação. Além disso, um replicão pode ser um plasmídeo de elevado ou baixo número de cópias. Um plasmídeo de elevado número de cópias terá geralmente um número de cópias que varia desde cerca de 5 a cerca de 200, e normalmente cerca de 10 a cerca de 150. Um hospedeiro contendo um plasmídeo de elevado número de cópias conterà de preferência pelo menos cerca de 10, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 20 plasmídeos. Ou um vector com um elevado ou baixo número de cópias pode ser selecionado, dependendo do efeito do vector e da proteína estranha no hospedeiro.

Alternativamente, as construções de expressão podem ser integradas no genoma bacteriano com um vector de integração. Vectores de integração contêm normalmente pelo menos uma sequência homóloga ao cromossoma bacteriano que permite que o vector se integre. As integrações parecem resultar de recombinações entre ADN homólogo no vector e o cromossoma bacteriano. Por exemplo, vectores de integração construídos com ADN de várias estirpes de *Bacillus* integram o cromossoma de *Bacillus* (EP 0127328). Vectores de integração também podem ser constituídos por sequências de bacteriófagos ou transposões.

Normalmente, as construções de expressão extracromossômica e de integração podem conter marcadores selecionáveis para permitir a seleção de estirpes bacterianas que foram transformadas. Os marcadores selecionáveis podem ser expressos no hospedeiro bacteriano e podem incluir genes que tornam as bactérias resistentes a fármacos, como a ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina (neomicina), e tetraciclina [Davies et al. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469]. Os marcadores selecionáveis podem também incluir genes biossintéticos, tais como os da histidina, triptofano, leucina e vias biossintéticas. Alternativamente, alguns dos componentes acima descritos podem ser colocados em conjunto em vectores de transformação. Os vectores de transformação são geralmente compostos de um marcador selecionável que, ou é mantido numa replicação ou desenvolvido num vector de integração, como descrito acima.

Os vectores de expressão e transformação, quer replicões extra-cromossômicos ou vectores de integração, têm sido desenvolvidos para transformação em muitas bactérias. Por exemplo, vectores de expressão têm sido desenvolvidos para, *inter alia*, as seguintes bactérias: *Bacillus subtilis*

[Paiva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP 0036259 e EP 0063953; WO 84/04541]; *Escherichia coli* [Shimatake et al. (1981) Nature 292:128; Amann et al. (1985) Gene 40:183; Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; EP 0036776, EP 0136829 e EP 0136907], *Streptococcus cremoris* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptomyces lividans* [Patente US 4745056].

Métodos de introdução de ADN exógeno em hospedeiros bacterianos são bem conhecidos na técnica, e geralmente incluem tanto a transformação de bactérias tratadas com CaCl_2 ou outros agentes, tais como catiões bivalentes e DMSO. O ADN pode também ser introduzido em células bacterianas por electroporação. Os processos de transformação variam normalmente com a espécie bacteriana a ser transformada. Ver, por exemplo [Masson et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Paiva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP 0036259 e EP 0063953; WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:949, *Campylobacter*], [Cohen et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids, em Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W. Boyer e S. Nicosia); Mandel et al. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*], [Chassy et al. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler et al. (1988) Anal. Biochem 170:38, *Pseudomonas*]; [Augustin et al. (1990), FEMS Microbiol Lett. 66:203, *Staphylococcus*], [Barany et al.

(1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of Streptococcus lactis by electroporation, em: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti e R. Curtiss III); Perry et al. (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti et al. (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1:412, Streptococcus].

Geral

O termo "compreendendo" significa "incluindo", bem como "composto", por exemplo, uma composição "compreendendo" X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir algo por exemplo adicional X + Y.

O termo "cerca" em relação a um valor numérico x significa, por exemplo, $x \pm 10\%$.

A palavra "substancialmente" não exclui "completamente" por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Sempre que necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

"Identidade de sequência" é preferencialmente determinado pelo algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman como implementado no programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando uma pesquisa de lacuna afim com os parâmetros lacuna pena aberta = 12 e pena de extensão de lacuna = 1.

Depois do serogrupo, a classificação meningocócica inclui serotipo, serosubtipo e imunotipo, e o padrão de nomenclatura lista serogrupo, serotipo, serosubtipo, e imunotipo, cada um separado por uma vírgula, por exemplo,

B: 4: P1.15: L3, 7,9. Dentro do serogrupo B, algumas linhagens causam a doença muitas vezes (hiperinvasivas), algumas linhagens causam formas mais graves da doença do que outros (hipervirulentas), e outros raramente causam apenas doença. Sete linhagens hipervirulentas são reconhecidas, nomeadamente os subgrupos I, III e IV-1, complexos ET-5, complexos ET-37, fragmentação A4 e linhagem 3. Estes foram definidos por multilocus enzimático (MLEE), mas digitação sequência multilocus (MLST) também foi utilizada para classificar meningococos [referência 16]. Os quatro principais grupos hipervirulentos são complexos ST32, ST44, ST11 e ST8.

O termo "alquilo" refere-se a grupos alquilo, em ambas as formas linear e ramificada, o grupo alquilo pode ser interrompido com 1, 2 ou 3 heteroátomos selecionados a partir de -O-, -NH- ou -S-. O grupo alquilo pode também ser interrompido com 1, 2 ou 3 ligações duplas e/ou triplas. No entanto, o termo "alquilo", geralmente refere-se a grupos alquilo com sem interrupções de heteroátomos ou interrupções duplas ou triplas de ligações. Sempre que seja feita referência a alquilo C₁₋₁₂, pretende-se significar que o grupo alquilo pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 1 e 12 (por exemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). Do mesmo modo, quando é feita referência a alquilo C₁₋₆, pretende-se significar que o grupo alquilo pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 1 e 6 (por exemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

O termo "cicloalquilo" inclui cicloalquilo, policicloalquilo, e grupos cicloalcenilo, bem como combinações destes com grupos alquilo, tais como grupos cicloalquilalquilo. O grupo cicloalquilo pode ser interrompido com 1, 2 ou 3 heteroátomos selecionados a partir de -O-, -NH- ou -S-. No entanto, o termo

"cicloalquilo" refere-se geralmente a grupos cicloalquilo sem interrupções de heteroátomos. Exemplos de grupos cicloalquilo incluem grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo e adamantilo. Sempre que se faça referência a cicloalquilo C₃₋₁₂, pretende-se significar que o grupo cicloalquilo pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 3 e 12 (por exemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

O termo "arilo" refere-se a um grupo aromático, tal como fenilo ou naftilo. Sempre que é feita referência a arilo C₅₋₁₂, entende-se que o grupo arilo pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 5 e 12 (por exemplo, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

O termo " aril C₅₋₁₂ alquilo C₁₋₆" refere-se a grupos tais como benzilo, feniletilo e naftilmetilo.

Os grupos protetores de azoto incluem grupos sililo (tais como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tais como ftalimidas, trifluoroacetamidas, metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, t-butoxycarbonilo (Boc), benziloxycarbonilo (Z ou Cbz), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), 2 - (trimetilsilil) etoxycarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxycarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tais como β-trimetilsililetanesulfonil (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C₁₋₁₂, benzilo, benzidrilo, tritilo, 9-fenilfluorenilo, etc. Um azoto grupo protetor preferido é Fmoc.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a sequência de nucleótidos da região a montante de NMB1870.

A Figura 2 é uma representação esquemática da estrutura de proteínas TbpB e de antígenos NMB2132 e NMB1870. Os peptídeos líder e regiões ricas em glicina proximais são indicados. Cinco caixas conservadas estão indicadas por diferentes motivos e as suas posições são mapeadas na sequência da proteína.

A Figura 3 mostra o aumento nos níveis de NMB1870 em *N. meningitidis* MC58 durante a curva de crescimento.

A Figura 4 mostra o aumento em níveis de NMB 1870 no sobrenadante ao longo do mesmo período. Níveis PorA e níveis NMB1380 não aumentam. Os números acima das pistas referem-se a OD₆₂₀ nm da cultura. KO indica um NMB 1870 nocaute mutante de MC58 e WCL está para o controle inteiro lisado celular.

A Figura 5 mostra as OMVs sondadas com anti-NMB 1870.

A Figura 6 mostra a análise FACS de MC58 encapsulado ou um MC58 mutante não encapsulado usando anti-NMB 1870.

A Figura 7 é um Western blot de um gel de gradiente de SDS-PAGE, carregado com os lisados de células totais de altos (pistas 1 e 2), intermediários (3 e 4) e de baixos (5 & 6) expressores de NMB1870. Pista 7 contém um nocaute MC58 NMB1870. As pistas são as seguintes: (1) MC58, (2) H44/76, (3) NZ394/98, (4) 961-5945, (5) 67/00, (6) M1239; (7) MC58 Δ nmb1870.

A Figura 8 mostra FACS e os títulos bactericidas para cada um de um expressor elevado, médio e baixo, e também para o nocaute NMB 1870. O expressor intermediário e baixo têm sequências de aminoácidos idênticos NMB 1870, com uma identidade de 91,6% para MC58.

A Figura 9 é um dendrograma mostrando o agrupamento estirpe de acordo com as distâncias da proteína NMB 1870. As marcações '1', '2' e '3' indicam as três variantes. Os números em parêntesis retos indicam o número de estirpes com sequência idêntica presentes em cada ramo do dendrograma. As linhagens hipervirulentas são indicadas, seguido do número de estirpes, quando este é diferente do número total. Serogrupos diferentes de B também são mostrados. As três estirpes tipo (MC58, 961-5965 e M1239) e as outras estirpes utilizadas na análise sorológica estão dentro de círculos.

A Figura 10 é um alinhamento da sequência da variante 1 (MC58), variante 2 (961-5945), e da variante 3 (M1239). Os números de aminoácidos iniciam-se na cisteína prevista para ser o primeiro aminoácido da proteína madura. Fundos cinzentos e pretos indicam resíduos conservados e idênticos, respectivamente.

A Figura 11 mostra a análise FACS de soros contra a variante 1 (primeira linha), a variante 2 (segunda linha) e variante 3 (terceira linha), usando o tipo de estirpe da variante 1 (MC58), variante 2 (961-5945) e variante 3 (M1239). Os soros de controlo contra o polissacárido capsular são mostrados na linha 4 (anticorpo monoclonal Seam3). Soro de controlo contra uma proteína citoplasmática é mostrado na linha 5 (anti-NMB1380). A linha 6 contém os mutantes nocaute (KO) de cada tipo de estirpe, sondado com o anti-soro homólogo.

As Figuras 12 (variante 1), 13 (variante 2) e 14 (variante 3) mostram dendrogramas para as três variantes distintas de NMB 1870, classificadas por tipos de sequência multilocus (ST).

MODOS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

NMB1870 em serogrupo B tensão MC58 - identificação dos códon de início

O gene NMB1870 foi identificado nas sequências do genoma de MenB e MenA publicados pelo The Institute for Genomic Research (TIGR) e Sanger Center, respectivamente [2,4; NMB1870 e NMA0586]. No entanto, há uma discrepância em relação à posição do códon de iniciação ATG em que o códon de iniciação MenB está 120bp a montante do códon de iniciação de MenA. Em contraste com as duas anotações da técnica anterior, a presente invenção coloca o códon de iniciação de um códon GTG que está a jusante dos códons de iniciação da técnica anterior (18bp a jusante para MenA, 138bp para MenB) e está de acordo com a referência 8.

Como mostrado na Figura 1, o início de GTG (1) é consistente com a presença de um sítio de ligação ao ribossoma corretamente espaçado e com a previsão da assinatura lipoproteína. Na técnica anterior o códon de iniciação TIGR MenB é mostrado numa caixa, e o códon de iniciação Sanger MenA está num círculo. Repetições invertidas estão indicadas por setas horizontais.

NMB 1870 é um gene monocistrónico localizado 157 bases a jusante do códon de terminação do gene da aldolase de frutose-bisfosfato nmb1869. Em MenA Z2491 a organização global é semelhante, mas 31 pares de bases a montante do códon de partida GTG há uma inserção de 186 nucleótidos que são homólogos a uma região de repetição interna de IS1106 e estão flanqueados por dois pares de 16 bases de repetições invertidas. Um local putativo de ligação ao ribossoma (sombreado) está presente 8 bp a montante do códon de partida GTG. Uma caixa de pele (11/19 de identidade com o

consenso da caixa pele *E. coli* [178]; SEQ ID N°s: 74 e 75) está localizada 35bp a montante do códon de iniciação, como previsto por GCG FindPatterns a partir da SEQ ID N°: 75 e permitindo um máximo de nove desencontros. Sequências de promotores putativos foram também detectadas.

O pacote GCG Wisconsin suite (versão 10.0) foi utilizado para análise da sequência computadorizada de sequências de genes e proteínas. O programa PSORT [179] foi utilizado para a previsão de localização. NMB1870 tem a assinatura típica de uma lipoproteína exposta à superfície, caracterizada por um péptido de sinal com um motivo de lipo-caixa do tipo -Leu-XX-Cys-, em que a cisteína foi seguida por uma serina, um aminoácido geralmente associado com a localização da membrana exterior de lipoproteínas [180]. A lipo-caixa está perdida em gonococo devido a uma base de mudança de quadro único (G) de inserção após MC58 nucleotídeo 36, com o quadro de leitura correta a ser restabelecida por uma inserção 8bp após a posição 73.

A proteína madura MC58 está prevista ser uma lipoproteína com um peso molecular de 26964 Da e um pI de 7,96, e é caracterizada pela presença de quatro glicinas, a jusante do motivo da lipo-caixa.

A análise de predição da estrutura secundária usando o software PredictProtein [181] indica que NMB 1870 é uma proteína globular na sua maioria composta de folhas beta.

Análise da sequência

O algoritmo PSI-BLAST foi usado para pesquisas de homologia [182], usando o banco de dados de proteínas não redundante. Não foram encontradas proteínas homólogas pesquisando bancos de dados de proteína procariotas e eucariotas não redundantes existentes mantidas no local do NCBI, incluindo

o genoma humano, o que sugere que NMB1870 é específico para *Neisseria*. No entanto, um domínio com alguma homologia (28% de identidade de mais de 146 aminoácidos) foi encontrado com a porção C-terminal da proteína de ligação de transferrina TFBA de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, [183] (Figura 2). Um olhar mais atento a este domínio revelou homologia também com as proteínas de ligação de transferrina de *N. meningitidis* [184], *H. influenzae* [185], *Moraxella catarrhalis* [186] e com o antigénio de superfície NMB2132 de *N. meningitidis*, anteriormente comentada como homólogo TbpB [3].

Para verificar se esta homologia de sequência reflete uma homologia funcional, NMB1870 recombinante (ver abaixo), transferrina humana hTF (Sigma T-4132) e a mistura dos dois (concentração final de 7 μ M) foram dialisadas O/N em PBS a 4°C. Após a diálise 20 μ l de cada proteína e a mistura delas foram carregadas numa coluna de HPLC PC 3.2/30 de filtração em gel Superdex 200 (Amersham), utilizando PBS como tampão de execução [187]. Blue Dextran 2000 e padrões de peso molecular de ribonuclease A, quimotripsina A, ovalbumina A, albumina do soro bovino (Amersham) foram usados para calibrar a coluna. A filtração em gel foi realizada usando um sistema inteligente, com uma taxa de fluxo de 0,04 ml/min e o material eluído controlado a 214 nm e 280 nm. (O volume de retenção NMB1870 foi 1,68 ml e 1,47 ml de hTF.) As fracções de 40 μ L foram recolhidas e analisadas por SDS-PAGE. O MC58 recombinante de ligação à proteína transferrina 2 (Tbp2), foi utilizado como controlo positivo.

A proteína recombinante não se conseguiu ligar à transferrina humana *in vitro*.

A caixa de pele no promotor sugere que a expressão de NMB1870 pode ser regulada por ferro. No entanto, a expressão da proteína não parece aumentar em condições de ferro baixo.

Uma característica interessante da proteína é a presença de um trecho de quatro glicinas a jusante da cisteína lipídada. Três ou mais glicinas consecutivas a jusante a partir de uma cisteína lipídada estão presentes também em outras cinco lipoproteínas de *N. meningitidis*, ou seja, a proteína de ligação de transferrina B (TbpB), o componente da membrana exterior de um transportador ABC NMB0623, a proteína hipotética NMB1047, a TbpB homóloga NMB2132, e a lipoproteína Aspa [188]. Em nenhuma destas proteínas do estiramento poli-glicina é codificado por um trato de poli-L, o que sugere que esta característica não é utilizada para gerar a modulação antigénica.

A pesquisa de lipoproteínas com uma região rica em glicina foi realizada em 22 sequências genómicas completas recuperados no local NCBI [189] usando FindPatterns. A pesquisa recuperou 29 lipoproteínas em algumas, mas não todas as espécies bacterianas. Os organismos com este tipo de lipoproteínas incluem tanto bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, enquanto que outros, tais como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* e *Vibrio cholerae* não têm nenhuma. A maior parte das lipoproteínas com esta assinatura pertencem a transportadores ABC, seguido por proteínas de função desconhecida. Embora esta característica comum na estrutura primária sugira um papel comum para as repetições tne da glicina, até agora, a função é desconhecida. No entanto, pode servir para guiar

as lipoproteínas de uma via específica de secreção e localização da superfície [190].

Sequenciamento para outras estirpes

70 estirpes representativas da diversidade genética e geográfica da população *N. meningitidis* foram selecionados para uma investigação mais aprofundada de NMB1870. As estirpes derivam de 19 países diferentes, 73% pertencem ao serogrupo B, e 32 foram isoladas nos últimos cinco anos. O painel de estirpes inclui principalmente as estirpes do serogrupo B, algumas estirpes dos serogrupos A, C, Y, W-135 e Z, e uma estirpe de cada um de *N. gonorrhoeae* e *N. cinerea*. As estirpes estão descritas em mais pormenor nas referências 191 e 192. Algumas estirpes estão disponíveis na ATCC (por exemplo, estirpe MC58 está disponível sob a referência BAA-335).

O gene NMB1870 foi amplificado utilizando os iniciadores externos da sequência de codificação (A1, SEQ ID 55, e B2, SEQ ID 56). Cerca de 10 ng de ADN cromossómico foi utilizado como molde para a amplificação. As condições de PCR foram: 30 ciclos, 94°C durante 40", 58° C durante 40", 68°C durante 40". O fragmento de PCR foi purificado pelo Kit de Purificação da Qiagen QIAquick PCR, e submetido a análise de sequência, a qual foi realizada usando um sequenciador automático ABI 377. A sequenciação foi efectuada utilizando os iniciadores A1, B2, 22 (SEQ ID 57) e 32 (SEQ ID 58).

O gene foi detectado por PCR em todas as 70 estirpes de *Neisseria*. Em *N. lactamica* uma banda pode ser detectada por transferência Western, mas o gene não pode ser amplificado.

A sequência de nucleótidos do gene foi determinada em todas as 70 estirpes. Um total de 23 sequências de proteínas

diferentes foi codificado (SEQ ID N°s 1 a 23). A análise computadorizada dessas 23 sequências, usando o algoritmo Kimura e de Jukes-Cantor, dividiu-as em três variantes (Figura 9). O dendrograma foi obtido a partir do alinhamento de sequências múltiplo de sequências da proteína NMB1870 (engavetamento) usando a sequência de proteína do Método Parsimony (ProtPars), um programa disponível no Phylogeny Inference Package (Phylip) e confirmada pelas distâncias do programa GCG, usando os algoritmos Kimura e de Jukes-Cantor.

As sequências NMB1870 de 100 outras estirpes foram determinadas. Muitas destas eram idênticos a uma das SEQ ID N°s 1 a 23, mas mais de 19 sequências únicas são apresentadas como SEQ ID N°s 140-158.

As Figuras 12-14 mostram dendrogramas das várias sequências, classificadas por tipos de sequência multilocus ST. Dentro da variante 1 (Figura 12), a estirpe de referência é MC58, com a sequência de mais baixa identidade com a referência a ser 89,4% contra uma média de 93,7%. Dentro da variante 2 (Figura 13), a estirpe de referência é 2996 e sequências estendem-se até 93,4% de identidade (média 96,3%). Dentro da variante 3 (Figura 14) a menor identidade das estirpes de referência M1239 é de 94,7% (média 95,8%). ST32cpx é o aglomerado hipervirulento mais homogêneo, abrigando apenas uma sequência NMB8170 da variante 1 (também apenas uma forma de NMB1343 e de NADA). A maioria das estirpes ST44cpx abriga a variante 1 (várias sequências diferentes) de NMB1870, com algumas tendo a variante 3 (sequência única). Estes dados sugerem que ST32cpx está mais perto de ST44cpx, em comparação com outros grupos, o que coincide com os dados com base no genótipo de porA (classe III). Os complexos ST11 e ST8 são principalmente representados por sequências diferentes

dentro da variante 2 de NMB 1870, sugerindo que estes complexos são mais próximos, em comparação com outros grupos, e combinando o genótipo porA (classe II). ST11cpx abriga todas as três variantes, indicando que é o aglomerado hipervirulento mais diverso dos quatro.

As estirpes MC58, 961-5945 e M1239 foram arbitrariamente selecionadas como estirpes do tipo de variantes 1, 2 e 3, respectivamente. A diversidade de sequências entre as três estirpes tipo é mostrada na Figura 10. Identidade de aminoácidos foi de 74,1% entre a variante 1 e a variante 2, 62,8% entre a variante 1 e a variante 3, e de 84,7% entre a variante 2 e a variante 3. Sequências dentro de cada variante foram bem conservadas, mostrando a mais distante 91,6%, 93,4% e 93,2% de identidade com as estirpes do seu tipo, respectivamente. *N.cínerea* pertence à variante 1, e partilha 96,7% de homologia com MC58. Como mostrado na Figura 9, a variante 1 abriga todas as estirpes de linhagens hipervirulentas ET-5, a maioria das estirpes da linhagem 3, as estirpes do serogrupo A, dois isolados recentes de W-135 e um ET-37. A variante 2 abriga todas as estirpes do complexo hipervirulento A4, dos serogrupos Y e Z, um W-135 antigo isolado e cinco estirpes ET-37. A variante 3 abriga quatro estirpes únicas ST, uma estirpe ET-37, uma estirpe da linhagem 3 e gonococo.

As estirpes em cada grupo de variantes, e as suas sequências de NMB 1870, são as seguintes:

1	gb185 (sequence shared with ES14784, M.00.0243291) m4030 (sequence shared with M3812) m2197 m2937 iss1001 (sequence shared with NZ394/98, 67/00, 93/114, bz198, m1390, nge28, 14996, 65/96, ISS1120, S59058, ISS1017, ISS1043, ISS1026, ISS1102, ISS1106, ISS656, ISS678, ISS740, ISS749, ISS995, ISS845, ISS1167, ISS1157, ISS1182, M4717, M6094, D8273) lnp17592 (sequence shared with 00-241341, 00-241357, 2ND80, 2ND221, ISS1142) f6124(sequence shared with 205900) m198/172 (sequence shared with bz133, gb149, nm008, nm092, ES14963, FN131218, S5902, S90307, M4105, ISS1180, FN131345) mc58 (sequence shared with 30/00, 39/99, 72/00, 95330, bz169, bz83, cu385, h44/76, m1590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44/89, 14847, ES14898, lnp15709, lnp17391, lnp17503, FN131654, M3985, S590104, S9029, S9097, D8346, FN131682, ISS832, ISS648, ISS1067, ISS1071, ISS1159) FN131217 ES14933 GB0993 M6190 F19324 ISS1113 gb0345 (sequence shared with M1820, ISS1082) M0445	17 sequences, 98 strains
2	L93/4286 m2671 961-6945 (sequence shared with 2996, 96217, 312294, 11327, a22, ISS1141, ISS1173, ISS759, ISS743, ISS866, F17094, NMB, SWZ107) gb013 (sequence shared with e32, m1090, m4287, 66094, M3153, M4407, NGH36) 860800 (sequence shared with 599) 95N477 (sequence shared with 90-18311, c11, m986, F370/85, M.00.0243143, ISS838, ISS839, ISS1092, M1569) 1000 (sequence shared with m1096, M2552, M4458, M5149, M6208) m3279 (sequence shared with bz232, dk353, m3697, ngh38, M5258, D8221) MK82 8047 C4678 ISS1133 NG6/88 M0579 F16325	15 sequences, 56 strains
3	16889 m3813 m1239 ngp165 gb355 (sequence shared with m3369, D8300, gb0364, M2441) gb988 [fa1090 gonococcus]	7 sequences, 11 strains
NB: the abbreviation "gb" at the beginning of a strain name means "M.01.0240".		

As SEQ ID N°s 139 (estirpe 220173i), 140 (estirpes gb101 & ISS908) e 141 (estirpe nge31) estão distantes destas três variantes (como está, em menor grau, a estirpe m3813).

Dentro da variante 1, a sequência da estirpe lnp17592 (também visto em estirpes 00-241341, 00-241357, 2ND80. 2ND221 & ISS1142) é vista no serogrupo W-135 Haji. Dentro das estirpes Haji, a sequência NadA (SEQ ID N°: 143) é uma recombinação entre alelos 2 e 3 [191,192].

Clonagem, expressão e purificação em E.coli

Os genes NMB1870 foram amplificados por PCR a partir do genoma de *N. meningitidis* MC58, estirpes 961-5945 e M1239. Iniciadores diretos e inversos foram concebidos para amplificar a sequência de codificação nmb1870 desprovida da sequência que codifica para o péptido líder putativo. Variantes M1239 e 961-5945 foram consideradas não serem exprimíveis em *E.coli*. Foram, por conseguinte, expressas por adição ao N-terminal da sequência de SEQ ID N°: 46, que está presente na proteína do gonococo, mas ausente na contraparte meningococo. Os oligonucleótidos utilizados para a amplificação foram como se segue:

Strain	Forward	Reverse
MC58	CGCGGATCCCATATGCGTGGCGCGCGACATCG (For1; SEQ ID 47)	CCCGCTCGAGTTGCTTGGCGGCAAGGC (Rev1; SEQ ID 48)
961/5945	CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACGCCTGCAGCAGC GGAGGGTCGCCGCCGACATCGG ('For2'; SEQ ID 49)	CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC (Rev2; SEQ ID 50)
M1239	CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCC TGCAGCAGCGGAGGGGAGGGGGTGGTGTCCG (For3; SEQ ID 51)	GCCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC (Rev3; SEQ ID 52)

Os locais de restrição, o que corresponde a *Nde* I para os iniciadores diretos e *Xho*I (*Hind*III para M1239) para os iniciadores reversos, estão sublinhados. Para os iniciadores diretos 961-5945 e M1239, a parte da sequência gonococo é relatada em itálico, e as sequências correspondentes meningocócicas NMB 1870 são relatadas em negrito.

As condições de PCR, no caso da combinação de iniciadores For1/Rev1 foram: desnaturação a 94°C durante 30", hibridação a 57°C durante 30", alongamento a 68°C durante 1 min (5 ciclos), desnaturação a 94°C durante 30", hibridação a 68°C durante 30", alongamento a 68°C durante 1 min (30 ciclos). No caso de combinações de iniciadores: For2/Rev2 e For3/Rev2 e For3/Rev3: 94°C durante 30", 56° C durante 30", 68°C durante 1 min (5 ciclos), 94°C durante 30", 71°C durante 30", 68°C durante 1 min (30 ciclos).

O gene *nmb1870* de comprimento total foi amplificado a partir do genoma MC58 usando os seguintes iniciadores: f-1For (CGCGGATCC CATATG AATCGAACTGCCTTCTGCTGCC; SEQ ID 53) e f-1REV (CCCG CTCGAG TTATTGCTTGGCGGCAAGGC; SEQ ID 54) e as seguintes condições: 94°C durante 30", 58°C durante 30", 72°C durante 1 min (30 ciclos).

PCR foram realizadas em aproximadamente 10 ng de DNA cromossômico usando polimerase de ADN High Fidelity Taq (Invitrogen). Os produtos de PCR foram digeridos com *NdeI* e *XhoI* e clonados nos locais *NdeI/Xho* do vector de expressão pET-21 b + (Novagen).

As proteínas recombinantes foram expressas como fusões de His-tag em *E. coli* e purificadas por MCAC (cromatografia de afinidade quelante de metal), tal como descrito anteriormente [3], e utilizadas para imunizar ratinhos para obter antissoros. *E.coli* DH5a foi utilizada para o trabalho de clonagem e BL21 (DE₃) foi utilizado para a expressão.

Mutantes isogénicos *nmb1870* e *siaD*

Mutantes nocaute isogénicos nas quais o gene *nmb1870* foi truncado e substituído por uma cassette de antibiótico eritromicina, foram preparados por transformação das estirpes MC58, 961-5945 e M1239 com o plasmídeo *pBS Δ*

nmb1870ERM. Este plasmídeo contém o gene de resistência à eritromicina no *nmb1870* a montante e a jusante flanqueando as regiões de 500pb. Estas regiões foram amplificadas a partir do genoma MC58 usando os seguintes oligonucleotídeos UFOR GC TCTAGA CCAGCCAGGCGCATAC (SEQ ID 59, local *XbaI* sublinhado); URev TCC CCCGGG GACGGCATTGTTTACAGG (SEQ ID 60, *SmaI* sublinhada); DFor TCC CCCGGG CGCCAAGCAATAACCATTG (SEQ ID 61, *SmaI* sublinhada) e Drev CCCG CTCGAG CAGCGTATCGAACCATGC (SEQ ID 62, *XhoI* sublinhada). Uma cápsula mutante deficiente foi gerada utilizando a mesma abordagem. O gene *siaD* foi suprimido e substituído com *ermC* usando o plasmídeo *pBSACapERM*. As regiões que flanqueiam a montante e a jusante de 1000 pb e 1056 pb, respectivamente, foram amplificadas a partir do genoma MC58 usando os seguintes iniciadores: UCapFor GC TCTAGA TTCTTTCCCAAGAACTCTC (SEQ ID 63, *XbaI* sublinhada); UcapRev TCC CCCGGG CCCGTATCATCCACCAC (SEQ ID 64, *SmaI* sublinhada); DCapFor TCC CCCGGG ATCCACGCAAATACCCC (SEQ ID 65, *SmaI* sublinhada) e DCapRev CCCG CTCGAG ATATAAGTGGGAAGACGGA (SEQ ID 66, *XhoI* sublinhada). Os fragmentos amplificados foram clonados em pBluescript e transformados na estirpe naturalmente competente MC58 de *N. meningitidis*. A mistura foi manchada sobre uma placa de agar GC, incubada durante 6 horas a 37°C, 5% de CO₂, em seguida, diluída em PBS e espalhada em placas de agar GC, contendo 5 µg/ml de eritromicina. A deleção do gene *nmb1870* nas estirpes MC58Δ*nmb1870*, 961-5945Δ*nmb1870* e M1239Δ*nmb1870* foi confirmada por PCR; a falta de expressão NMB1870 foi confirmada por análise de Western blot. A deleção do gene *siaD* e a falta de expressão da cápsula na estirpe MC58Δ*siaD* foram confirmadas por PCR e FACS, respectivamente.

Lipoproteínas

Para investigar a lipidação de NMB1870, a incorporação de palmitato de recombinante da estirpe de *E. coli* BL21 (DE₃) portadora do gene de comprimento completo nmb1870 foi testada como descrito na referência 193.

Estirpes meningocócicas MC58 e MC58 Δ nmb1870 foram cultivadas em meio de CG e marcadas com ácido [9,10-³H]-palmítico (Amersham). As células a partir de 5 ml de cultura foram lisadas por fervura durante 10 min e centrifugadas a 13000 rpm. Os sobrenadantes foram precipitados com TCA e lavados duas vezes com acetona fria. As proteínas foram suspensas em 50 μ l de 1,0% de SDS e 15 μ l analisadas por SDS-PAGE, coradas com azul brilhante de Coomassie, fixas e embebidas durante 15 minutos em solução de Amplify (Amersham). Os géis foram expostos a Hyperfilm MP (Amersham) a -80°C durante três dias.

A banda radioativa de peso molecular adequado foi detectada em MC58, mas não no mutante nocaute Δ nmb1870.

E. coli recombinante cultivada na presença de ácido [9,10-³H]-palmítico também produziu uma banda radioativa com o peso molecular esperado, confirmando que a *E. coli* reconhece o motivo lipoproteína e adiciona uma cauda lipídica à proteína recombinante.

Detecção de Proteínas

A estirpe MC58 foi cultivada a 37°C com 5% de CO₂ em meio de GC em fase estacionária. As amostras foram coletadas durante o crescimento (OD_{620 nm} 0,05-0,9). MC58 Δ nmb1870 foi cultivado até OD_{620 nm} 0.5. As células bacterianas foram

recolhidas por centrifugação, lavadas uma vez com PBS, ressuspendidas em vários volumes de PBS, a fim de normalizar os valores de DO. O sobrenadante da cultura foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm e 1 ml precipitados pela adição de 250 µl de 50% de ácido tricloroacético (TCA). A amostra foi incubada em gelo durante 2 horas, centrifugada durante 40 min a 4°C e o sedimento lavado com etanol frio a 70% e ressuspendida em PBS. 3 µl de cada amostra (correspondendo a um OD₆₂₀ 0,03) foi então carregada sobre um gel de 12% de poliacrilamida e electrotransferidas para membranas de nitrocelulose.

A análise Western blot foi realizada de acordo com os procedimentos padrão, utilizando anticorpos policlonais produzidos contra a proteína expressa em *E. coli*, a uma diluição de 1:1000, seguido de uma diluição 1/2000 de HRP marcado de anti-IgG humana (Sigma). A varredura foi realizada utilizando um LabScan (Pharmacia) e software ImageMaster (Pharmacia).

Como mostrado na Figura 3, uma proteína de ~ 29,5 kDa foi detectada nos extractos totais de células de *N. meningitidis*. A quantidade de proteína em todo o ligado celular, aproximadamente, dobrou durante a curva de crescimento, enquanto a densidade óptica da cultura aumentou de 0,05-0,9 OD_{620nm}. Uma banda do mesmo tamanho foi também detectada no sobrenadante da cultura. A proteína não foi detectada no sobrenadante de cultura recém-inoculada (OD_{620nm} 0,05), e aumentou aproximadamente quatro vezes durante o crescimento de 0,1 a 0,9 OD_{620 nm} (Figura 4, painel da esquerda). A verdadeira natureza da expressão no sobrenadante foi confirmada testando as mesmas amostras para bolhas de membrana e proteínas citoplasmáticas. Como mostrado no painel do meio da Figura 4, a ausência de PorA nas preparações do sobrenadante de PorA exclui uma possível

contaminação com vesículas de membrana, enquanto a ausência do sobrenadante de proteína citoplasmática NMB1380 confirmou que as amostras do sobrenadante não resultam da lise celular (painel da direita).

A estirpe KO MC58 Δ nmb1870 mostra nenhuma proteína tanto no lisado de células inteiras como no sobrenadante de cultura (pistas 'KO' nas Figuras 3 e 4).

NMB1870 foi detectada por transferência Western, em vesículas de membrana externa, que confirmam que a proteína segrega com as frações de membrana de *N.meningitidis* (Figura 5). No entanto, os soros de ratinhos imunizados com as OMVs não reconhecem NMB1870 recombinante em western blot, sugerindo que a proteína não é imunogénica em preparações de OMV.

A análise FACS utilizando anticorpos anti-NMB 1870 confirmaram que a proteína está exposta à superfície e acessível aos anticorpos, tanto nas estirpes de *N. meningitidis* encapsuladas e não encapsuladas (Figura 6). A análise FACS utilizado um citómetro de fluxo FACS-Scan, com a ligação do anticorpo detectada usando um anticorpo secundário anti-rato (molécula completa) conjugada com FITC (Sigma). Os controlos FACS positivos usaram SEAM3, um mAb específico para o polissacarídeo capsular do meningococo B [194], o controle negativo consistiu num anti-soro policlonal rato contra a proteína citoplasmática NMB1380 [195].

A análise Western blot de 43 estirpes mostrou que NMB 1870 é expressa por todas as estirpes testadas. Como mostrado na Figura 7, no entanto, os níveis de expressão variaram consideravelmente de estirpe para estirpe. As estirpes

testadas poderiam ser classificadas como expressadores altas, intermediárias e baixas:

Strains	High	Intermediate	Low
ET5	9/9	0/9	0/9
Lineage 3	7/9	1/9	1/9
ET37	2/3	1/3	0/3
A4	0/4	2/4	2/4
Other	6/15	7/15	2/15
<i>N. gonorrhoeae</i>	0/1	0/1	1/1
<i>N. cinerea</i>	0/1	0/1	1/1
<i>N. lactamica</i>	1/1	0/1	0/1
Total	25/43 (58%)	11/43 (25.5%)	7/43 (16.5%)

A maioria das estirpes de linhagens hipervirulentas (ET-5, linhagem 3, ET-37) expressavam níveis elevados de proteína, com a exceção de A4 em que duas estirpes expressaram níveis intermédios e duas expressaram níveis baixos. Curiosamente, a proteína foi expressa ao mais alto nível por estirpes que foram utilizados classicamente como estirpes de vacina OMV. nenhuns padrões genéticos óbvios foram encontrados para prever a quantidade de proteína expressa por cada uma das estirpes. Mesmo a presença do elemento IS na região promotora, que foi encontrado em 8/70 estirpes (uma do serogrupo A, três da linhagem 3, e quatro daquelas classificados como outras), não demonstrou qualquer correlação com a expressão do proteína.

A digitalização das manchas de Western mostrou que a diferença na expressão entre intermédia e alta, intermédia e baixa ou alta e baixa pode ser de dois, cinco e nove vezes, respectivamente. Não há nenhum motivo imediato aparente para os diferentes níveis de expressão, e a análise das sequências de ADN a montante do gene não

mostrou qualquer característica que se correlaciona com a expressão.

As respostas de anticorpos

Os soros de indivíduos saudáveis e convalescentes foram analisados para os anticorpos anti-NMB1870 por Western Blot. NMB1870 purificado (1 µg/pista) foi carregado para 12,5% de gel de poliacrilamida-SDS e transferido para uma membrana de nitrocelulose. A proteína ligada foi detectada com diluição de soro 1/200, seguido por uma diluição 1/2000 de HPR marcado anti-IgG humana (Sigma). Enquanto apenas 2/10 de soro de pessoas saudáveis reconheceu a NMB1870, 21/40 soros de convalescentes reconheceram a proteína, levando à conclusão de que a NMB1870 é imunogénica *in vivo* durante a infecção. Os antissoros de ratinhos imunizados com proteína recombinante NMB1870 foram, por conseguinte, investigados.

Para preparar soros, 20 µg da variante 1, variante 2 e variante 3 das proteínas recombinantes NMB 1870 foram utilizadas na imunização de ratos fêmeas CD1 (Charles River), com seis semanas de idade. Foram utilizados quatro a seis ratos por grupo. As proteínas recombinantes foram dadas ip, em conjunto com adjuvante completo de Freund (CFA) para a primeira dose e adjuvante incompleto de Freund (IFA) para a segunda (dia 21) e terceira (dia 35) doses de reforço. O mesmo esquema de imunização foi realizado utilizando o adjuvante de hidróxido de alumínio (3 mg/ml) em vez do adjuvante de Freund. As amostras de sangue para análise foram tomadas no dia 49.

Os antissoros foram testados quanto à sua capacidade para induzir a morte mediada pelo complemento de estirpes de *N.*

meningitidis capsuladas, como previamente descrito [3, 196] utilizando soro de coelho bebé reunido (Cedarlane) usado como fonte de complemento. O soro de um ser humano adulto saudável (sem atividade bactericida intrínseca quando testado a uma concentração final de 25 ou 50%) foi também usado como fonte de complemento. Os títulos bactericidas do soro foram definidos como a diluição de soro que resulta numa diminuição de 50% nas unidades de formação de colónias (CFU) por ml após 60 minutos. A incubação de bactérias com a mistura de reação, em relação ao controle de CFU por ml, no tempo 0. Normalmente, as bactérias incubadas com o anticorpo de controlo negativo, na presença de complemento apresentaram um aumento de 150 a 200% em UFC/ml, durante a incubação de 60 minutos.

Estirpes representativas dos expressores elevados, intermédios e baixos foram escolhidos para o ensaio. A expressão diferencial da proteína na superfície das estirpes selecionadas foi confirmada por análise de FACS (Figura 8) - MC58, uma representante das estirpes de expressores elevados foi morta com alta eficiência pelo soro diluído até 1/64000; NZ394/98 (originalmente NZ98/254), um representante dos expressores intermediários também foi morto com alta eficiência, pelo soro diluído até 1/16000 e até mesmo a estirpe 67/00, uma representante das estirpes de expressores baixos foi morto pelo antissoro diluído até para 1/2048. Estirpes de controlo, onde o gene *nmb1870* tinha sido nocauteado, não foram mortas pelo mesmo antissoro.

Para confirmar se os soros também foram capazes de conferir proteção *in vivo*, foram testados quanto à capacidade de induzir a proteção passiva, no modelo de rato lactente. Ratos lactentes de cinco dias de idade foram pré-tratados ip com antissoros NMB1870 ou com anticorpo monoclonal anti-

PorA no tempo 0 e desafiados duas horas mais tarde ip com 5×10^3 CFU/rato de MenC 4243 (OAc-positivo) ou MenB NZ394/98. Hemoculturas quantitativas foram obtidas 24 horas depois. A contagem bacteriana nas culturas de sangue (UFC/ml, médias geométricas) foi obtida por plaqueamento do sangue em placas de chocolate de ágar. Soro de controle positivo foi o anti-PorA (P1.2) para MenC e SEAM3 para MenB. Os resultados das experiências foram os seguintes:

Pre-treatment	Challenge Strain 4243		Challenge Strain NZ394/98	
	Positives	CFU/ml $\times 10^3$	Positives	CFU/ml $\times 10^3$
PBS	5/5	450	-	-
Negative control serum	5/5	500	9/14	1260
Positive control serum	1/5	0.003	0/7	<0.001
Anti-NMB 1870	0/9	<0.001	0/14	<0.001

Portanto, não foram recuperadas colônias bacterianas a partir do sangue dos ratos passivamente imunizados com soro anti-NMB1870, enquanto a maioria dos animais do controle negativo foram bacterêmicos.

A atividade bactericida é específica da variante

Cada tipo de variante foi expressa em *E. coli* como uma proteína marcada com His e utilizado para imunizar ratinhos. Os soros foram usados para testar a reatividade cruzada imunológica entre as estirpes das três variantes por FACS e ensaio bactericida. Como mostrado na Figura 11, por análise FACS, todas as estirpes foram reconhecidas por cada soro, embora o grau de reconhecimento varie consideravelmente, geralmente reflete a homologia de aminoácidos entre as proteínas.

Em análise mais aprofundada, o antissoro da variante-1 (Figura 11, primeira linha) reconheceu a estirpe MC58 muito

bem (como esperado), numa extensão inferior a estirpe 961-5945 (74,1% de identidade) e, em menor grau, a estirpe M1239 (62,8% de identidade). Uma tendência semelhante foi encontrada para antissoros contra as variantes 2 e 3 (linhas 2 e 3 da Figura 11), embora com o soro anti-variante-2, as diferenças não foram tão marcantes.

Um anticorpo monoclonal contra a cápsula reconheceu as três estirpes igualmente bem (linha 4), enquanto um soro contra a proteína citoplasmática NMB1380 usado como controle negativo não reconheceu nenhum (linha 5). Da mesma forma, os mutantes nocaute NMB 1870 não foram reconhecidos por qualquer soro (linha 6).

As diferenças em imunoreconhecimento entre as variantes foram mais evidentes por ensaio bactericida:

Sera	MC58 (variant 1)	961/5945 (variant 2)	M1239 (variant 3)
Anti-variant 1	64000	256	<4
Anti-variant 2	<4	16000	128
Anti-variant 3	<4	2048	16000

Os dados mostram que o soro contra cada variante foi capaz de induzir uma morte mediada pelo complemento eficiente da estirpe homóloga (títulos variando entre 16000 e 64000), enquanto que a atividade era baixa (128-2,048) ou ausente (<4) contra estirpes das outras variantes. Como previsto a partir da homologia próxima de aminoácidos, os títulos bactericidas cruzados entre as variantes 2 e 3 foram maiores do que os outros. Quando foi utilizado o complemento humano, os títulos bactericidas de 4096, 256 e 512 foram obtidos com as variantes 1, 2 e 3, respectivamente, usando as estirpes do tipo homólogo. Não foram detectados títulos contra as estirpes heterólogas.

Proteínas híbridas e em tandem

Proteínas híbridas e em tandem podem ser representadas pela fórmula: $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$. Os genes que codificam várias proteínas deste tipo foram construídos, em que $n = 2$, o terminal N de X_1 e X_2 são suprimidos até ao fim das suas regiões de poli-glicina, e L_2 - e -B- estão ausentes (ou então B é uma marcação de poli-histidina utilizada para a purificação). A tabela a seguir mostra os componentes destas proteínas nas suas formas maduras, e dá a SEQ ID N°s do polipéptido completo e a SEQ ID N°s e estirpes para as sequências do componente A, X_1 , L_1 , X_2 :

	SEQ ID	A	X_1	L_1	X_2	pl
(1)	79	-	MC58 (SEQ ID 80)	SEQ ID 78	2996 (SEQ ID 81)	6.74
(2)	82	-	MC58 (SEQ ID 80)	SEQ ID 144	2996 (SEQ ID 81)	6.63
(3)	83	-	MC58 (SEQ ID 80)	SEQ ID 78	M1239 (SEQ ID 84)	
(4)	85	-	MC58 (SEQ ID 80)	SEQ ID 144	M1239 (SEQ ID 84)	
(5)	87	SEQ ID 86	2996 (SEQ ID 81)	SEQ ID 78	M1239 (SEQ ID 84)	6.44
(6)	88	SEQ ID 86	2996 (SEQ ID 81)	SEQ ID 144	M1239 (SEQ ID 84)	6.35
(7)	89	SEQ ID 86	M1239 (SEQ ID 84)	SEQ ID 78	2996 (SEQ ID 81)	
(8)	90	SEQ ID 86	M1239 (SEQ ID 84)	SEQ ID 144	2996 (SEQ ID 81)	
(9)	91	Cys	'936' (SEQ ID 76)	SEQ ID 78	2996 (SEQ ID 81)	
(10)	92	Cys	'936' (SEQ ID 76)	SEQ ID 144	2996 (SEQ ID 81)	
(11)	93	Cys	'936' (SEQ ID 76)	SEQ ID 78	M1239 (SEQ ID 84)	
(12)	94	Cys	'936' (SEQ ID 76)	SEQ ID 144	M 1239 (SEQ ID 84)	

Destes doze proteínas, por conseguinte, oito são proteínas em tandem NMB1870 (MW ~ 55 kDa) e quatro são proteínas híbridas com '936₂₉₉₆' no N-terminal (MW-49kDa). Foram utilizados dois ligantes: (a) SEQ ID N°: 78, o qual é derivado do gonocócico NMB 1870 homólogo (SEQ ID N°: 46); e (b) um ligante rico em glicina (SEQ ID N°: 144). SEQ ID N°: 78 também foi usada na extremidade N-terminal de proteínas maduras, sem os seus dois resíduos N-terminal *Bam*HI (Gly-Ser), ou seja, a SEQ ID N°: 86.

Todas as doze proteínas eram solúveis quando expressas em *E. coli* e, após purificação, foram utilizadas para imunizar ratinhos. As respostas do anticorpo bactericida do soro (SBA) foram avaliadas contra até quatro estirpes de meningococo, assegurando uma de cada uma das três variantes NMB1870 1 a 3 (mostrado como sobrescritos). O adjuvante foi CFA (topo) ou um hidróxido de alumínio (em baixo):

Protein	SBA			
	2996 ⁽²⁾	MC58 ⁽¹⁾	M1239 ⁽³⁾	961/5945 ⁽²⁾
(1)	4096 1024	262144 32768	2048 128	32768 2048
(2)	8192 1024	262144 16384	2048 512	32768 1024
(3)	- -	131072 32768	32768 4096	4096 1024
(4)	- -	262144 32768	32768 1024	8192 512
(5)	512 1024	<4 16	4096 4096	32768 8192
(6)	4096 2048	<4 16	32768 4096	32768 16384
(7)	- -	4 16	4096 4096	32768 8192
(8)	2048 1024	32 32	32768 8192	32768 16384
(9)	2048 4096	<4 <4	<4 512	32768 16384

Protein	SBA			
	2996 ⁽²⁾	MC58 ⁽¹⁾	M1239 ⁽³⁾	961/5945 ⁽²⁾
(10)	4096 512	<4 <4	256 <4	131072 2048
(11)	256 4	<4 4	>32768 4096	2048 128
(12)	2048 16	<4 256	>32768 4096	4096 256

Estes resultados mostram claramente a natureza específica variante das reações imunológicas. Por exemplo, as proteínas (1) e (2) incluem sequências de variantes 1 e 2 de NMB1870, e os melhores resultados SBA são vistos contra estas duas variantes. Do mesmo modo, os melhores resultados são observados contra as variantes 1 e 3 quando se utiliza proteínas (3) e (4). Boa atividade é vista usando variantes 2 e 3 de NMB1870, em qualquer ordem, a partir de N-terminal para C-terminal, utilizando proteínas (5) a (8), com pouca atividade contra a variante 1. A natureza específica da variante da resposta NMB 1870, também é evidente quando se utilizam as proteínas híbridas, com alguma atividade anti-2996 a ser fornecida pela porção '936 '.

Os seguintes iniciadores de oligonucleótidos foram utilizados durante a construção das 12 proteínas

Protein	Primer SEQ ID NOS (Fwd & Rev)	Restriction sites
(1)	95 & 96	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(2)	97 & 98	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(3)	99 & 100	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(4)	101 & 102	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(5)	103 & 104	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(6)	105 & 106	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(7)	107 & 108	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(8)	109 & 110	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(9)	111 & 112	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(10)	113 & 114	<i>Bam</i> HI & <i>Xho</i> I
(11)	115 & 116	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
(12)	117 & 118	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III
NMB1870 _{M1239}	119 & 120	<i>Nde</i> I & <i>Bam</i> HI
NMB1870 ₂₉₉₆	121 & 122	<i>Nde</i> I & <i>Bam</i> HI

Proteína em tandem triplo

Uma proteína "em tandem triplo", onde $n = 3$, foi construída com base nas estirpes (1) MC58, (2) e 2996 (3) m1239. A proteína 757mer em triplo tandem $\text{NH}_2\text{-A-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-X}_3\text{-L}_3\text{-B-COOH}$ tem a sequência de aminoácidos SEQ ID N°: 142:

Moiety	A	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	X ₃	L ₃	B
Detail	-	NMB1870 _{MC58}	Gly-rich linker	NMB1870 ₂₉₉₆	Gly-rich linker	NMB1870 _{m1239}	-	-
SEQ ID	-	80	144	81	144	84	-	-
Variant	-	1	-	2	-	3	-	-

X₂ e X₃ tem em falta o N-terminal até às suas regiões de poli-glicina (isto é, são sequências ΔG).

Títulos de SBA bactericidas

Os ratinhos foram imunizados com nove diferentes proteínas e a atividade bactericida dos soros resultantes foi testada contra diferentes estirpes de meningococo, incluindo ambas as estirpes, que correspondem aquelas a partir das quais as proteínas de imunização foram derivadas e estirpes que são diferentes das proteínas de imunização. As nove proteínas foram:

Proteínas híbridas (A), (B) e (C) de 936 e NMB1870

(A) NMB1870_{MC58} = variante 1 [12]

(B) NMB 1870₂₉₉₆ = variante 2 por exemplo, SEQ ID N°s: 91 e 92

(C) NMB 1870_{m1239} = variante 3 por exemplo, SEQ ID N°s: 91 e 92

Estirpes individuais (D), (E) e (F) a partir de NMB1870

(D) NMB1870_{MC58} = variante 1, por exemplo, SEQ ID N°: 80

(E) NMB1870₂₉₉₆ = variante 2, por exemplo, SEQ ID N°: 81

(F) NMB1870_{M1239} = variante 3, por exemplo, SEQ ID N°: 84

Proteínas em tandem (G), (H) e (I) NMB 1870

(G) NMB 1870_{MC58}-NMB1870₂₉₉₆ = variantes 1 e 2, por exemplo, SEQ ID N°s: 79 e 82

(H) NMB1870₂₉₉₆-NMB1870_{M1239} = variantes 2 e 3, por exemplo, SEQ ID N°s: 87 e 88

(I) NMB1870_{MC58}-NMB1870_{M1239} = variantes 1 & 3, por exemplo, SEQ ID N°s: 83 e 85

As respostas bactericidas foram medidas contra até 20 estirpes que possuem a variante 1 de NMB1870, contra até 22 estirpes com variante 2 de NMB 1870 e contra até 5 estirpes com variante 3.

A eficácia bactericida de soros criados contra as proteínas (A) a (C) combina o genótipo das estirpes de ensaio por exemplo, utilizando CFA como adjuvante para a imunização, os títulos de SBA contra a estirpe MC58 (variante 1) foram: (A) 262.144 (B) <4 (C) <4. Da mesma forma, quando os soros foram testados contra a estirpe 961-5945 (variante 2) SBA foram: (A) 256 (B) 32768, (C) 4096. Finalmente, contra a estirpe M1239 (variante 3) os títulos foram: (A) <4 (B), 512, (C) 32768.

Usando CFA ou hidróxido de alumínio como adjuvante, a proteína (A) deu títulos de SBA de ≥ 512 contra as seguintes estirpes: M01-240185, M2197, LPN17592, M6190 (todos ET37); MC58, BZ83, CU385, N44/89, 44/76, M2934, M4215 (todos ET5); BZ133; M1390, ISS1026, ISS1106, ISS1102

(lin. 3); F6124 (SIII) e M2937 (outros). Estas estirpes cobrem os serogrupos A, B, C e W 135; não foram testadas estirpes do serogrupo Y.

Usando CFA ou hidróxido de alumínio como adjuvante, a proteína (B) deu títulos SBA ≥ 512 contra as estirpes: 2996, 961-5945, 96217 (cluster A4); M01-240013, C11, NGH38, M3279, M4287, BZ232 (outros). Estas estirpes cobrem os serogrupos B e C; as estirpes do serogrupo A, W135 ou Y não foram testadas.

Usando CFA ou hidróxido de alumínio como adjuvante, a proteína (C) deu títulos SBA ≥ 512 contra as estirpes : M01-0240364, NGP165 (ET37), M1239 (lin. 3); M01-240355, M3369 (outros). Estas estirpes estão no serogrupo B; e não foram testadas estirpes do serogrupo A, C, W135 ou Y.

Os padrões de SBA observados com as proteínas (A) a (C) também foram observados com as proteínas de (D) a (F). Contra a estirpe MC58, o soro obtido utilizando a proteína (D) e adjuvante de hidróxido de alumínio deu um título de SBA de 16384, ao passo que os soros obtidos utilizando a proteína (E) ou (F) e o mesmo adjuvante deu os títulos de SBA <4 . Contra a estirpe 961-5945, os soros da proteína (D) e (F) tinham títulos mais baixos do que os obtidos utilizando (E). Contra a estirpe M1239, os títulos de SBA foram: (D) <4 (E) 128, (F) 16384.

Com proteínas em tandem, a eficácia SBA foi ampliada. Os soros obtidos utilizando a proteína (G) foram bactericidas contra a estirpe MC58 e 961-5945, bem como outras estirpes que possuem a variante 1 ou a variante 2 de NMB1870. Os soros utilizados contra a proteína (H) deu baixos títulos contra as estirpes que possuem a variante 1 de NMB1870, mas altos títulos contra outras estirpes, por exemplo, contra a

estirpe 16384 961-5945 (variante 2) e contra a estirpe 32768 M3369 (variante 3).

Os soros obtidos por imunização com a proteína adjuvante CFA (I) deu títulos SBA ≥ 512 contra: LNP17094, 96217, 961-5945, 2996, 5/99 (A4 cluster); C4678, M01-0240364, NGP165 (ET37), M1239 (lin 3.); M2552, BZ232, M3279, M4287, 1000, NGH38, C11, M01-240013, M01-240355, M3369 (outros). Estas estirpes cobrem os serogrupos B e C; a atividade contra as estirpes dos serogrupos A, W135 ou Y não foi testada com a proteína (I).

Após a imunização com as proteínas que contêm a variante 1 de NMB1870, os soros testados contra até 20 estirpes que têm uma NMB1870 na variante 1 deu os títulos de SBA como se segue:

Protein	(A)	(A)	(D)	(D)	(G)	(G)	(I)	(I)
Adjuvant	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
N° strains tested	18	20	20	20	13	13	11	11
SBA <128	1	7	4	3	0	5	0	2
SBA 128-512	2	4	0	4	0	3	0	3
SBA ≥ 512	15	9	16	13	13	5	11	6

Após a imunização com proteínas contendo a variante 2 de NMB1870, soros testados contra até 22 estirpes que têm uma NMB1870 na variante 2 deu títulos de SBA da seguinte forma:

Protein	(B)	(B)	(E)	(G)	(G)	(H)	(H)	(I)	(I)
Adjuvant	CFA	Alum	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
N° strains tested	16	19	22	16	15	22	22	7	6
SBA <128	6	14	13	6	10	7	8	3	5
SBA 128-512	0	2	7	3	3	1	6	0	1
SBA >512	10	3	2	7	2	14	8	4	0

Após imunização com as proteínas que contêm a variante 3 de NMB1870, os soros testados contra até cinco estirpes que têm uma NNM1870 na variante 3 deu os títulos de SBA como se segue:

Protein	(C)	(C)	(F)	(G)	(G)	(H)	(H)	(I)	(I)
Adjuvant	CFA	Alum	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum	CFA	Alum
N° strains tested	5	5	5	5	5	5	5	3	3
SBA <128	0	1	1	1	1	0	0	1	1
SBA 128-512	0	0	0	0	2	0	0	0	1
SBA >512	5	4	4	4	2	5	5	2	1

Conclusões

Em primeiro lugar, NMB1870 parece não ser um antigénio útil para imunização ampla - os seus níveis de expressão variam entre estirpes, existe variabilidade significativa de sequências, e não há nenhuma proteção cruzada entre as diferentes variantes. No entanto, demonstrou-se que mesmo as estirpes que expressam níveis muito baixos deste antigénio são susceptíveis aos soros anti-NMB1870. Além disso, a diversidade de sequências está limitada a três formas variantes de tal modo que a imunidade ampla pode ser conseguida sem a necessidade de um grande número de antigénios. Além disso, parece que estas três proteínas podem oferecer imunidade contra mais do que apenas o meningococo do serogrupo B.

As diferentes variantes de NMB1870 podem ser expressas em conjunto na forma de proteínas de fusão, a fim de dar cadeias polipeptídicas individuais que são ativas contra mais de uma variante.

NMB 1870 é imunogénico durante a infecção, é capaz de induzir anticorpos bactericidas e protege ratos infantis do desafio bacteriano.

Outras informações experimentais sobre NMB 1870 podem ser encontradas na referência 197.

Deve ser entendido que a invenção é descrita acima a título de exemplo apenas e modificações podem ser feitas mantendo-se dentro do âmbito da invenção como definido nas reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO:	Description
1-23	23 different NMB1870 sequences, full-length
24-45	22 different NMB1870 sequences, with N-terminus cysteines
46	N-terminal amino acid sequence used for expression
47-66	PCR primers
67-69	Partial sequences from Figure 1
70-73 & 86	Sequence motifs for retention or omission from proteins of the invention
74-75	Fur boxes
76	'936' from MC58, with leader peptide processed
77	Example of a 936 _{MC58} -ΔG-NMB1870 _{M1239} hybrid
78	Gonococcus-derived sequence used for chimeric expression
79, 82, 83, 85, 87, 88, 89, 90	Tandem NMB1870 proteins
80,81,84	Truncated NMB1870 sequences
91-94	Hybrid proteins of '936' and NMB1870
95-122	PCR primers
123-141	Full-length NMB1870 sequences
142	Triple tandem NMB 1870 sequence
143	Haji NadA sequence
144	Glycine linker

Referências

- [1] Jodar et al. (2002) Lancet 359 (9316) : 1499- 1508.
- [2] Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
- [3] Pizza et al. (2000) Science 287:1816-1820.
- [4] Parkhill et al. (2000) Nature 404:502-506.
- [5] <http://dna1.chem.ou.edu/gono.html>
- [6] WO99/24578.
- [7] WO99/36544.
- [8] WO99/57280.
- [9] WO00/22430.
- [10] WO01/64920.
- [11] WO01/64922.
- [12] WO03/020756.
- [13] WO03/063766.
- [14] Achtman (1995) Global epidemiology of meningococcal disease. Pages 159- 175 of Meningococcal disease (ed. Cartwright) . ISBN: 0- 471- 95259- 1.
- [15] Caugant (1998) APMIS 106:505-525.
- [16] Maiden et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3140-3145.
- [17] Reilly & Smith (1999) Protein Expr Purif 17:401-409.
- [18] Covacci & Rappuoli (2000) J. Exp. Med. 19:587-592.
- [19] WO93/18150.
- [20] Covacci et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5791-5795.

- [21] Tummuru et al. (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
- [22] Marchetti et al. (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- [23] Telford et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
- [24] Evans et al. (1995) *Gene* 153:123-127.
- [25] WO96/01272 & WO96/01273, especially SEQ ID NO:6.
- [26] WO97/25429.
- [27] WO98/04702.
- [28] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [29] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [30] International patent application WO03/007985.
- [31] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [32] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [33] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [34] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [35] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [36] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [37] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0- 7216- 1946- 0.
- [38] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- [39] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [40] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [41] Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [42] WO02/079243.
- [43] International patent application WO02/02606.
- [44] Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [45] Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- [46] Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- [47] International patent application WO99/27105.
- [48] International patent application WO00/27994.
- [49] International patent application WO00/37494.
- [50] International patent application WO99/28475.
- [51] Ross et al. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [52] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [53] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [54] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
- [55] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16; 47 (1) : 12, 19.
- [56] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [57] Schuchat (1999) *Lancet* 353 (9146) : 51- 6.
- [58] International patent application WO02/34771.
- [59] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [60] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [61] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357 (9264) : 1225- 1240; see also pages 1218- 1219.
- [62] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
- [63] Demicheli et al. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
- [64] Stepanov et al. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
- [65] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24:305-307.
- [66] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384.
- [67] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305-1326.
- [68] EP-A-0372501
- [69] EP-A-0378881
- [70] EP-A-0427347
- [71] WO93/17712
- [72] WO94/03208
- [73] WO98/58668
- [74] EP-A-0471177
- [75] WO00/56360
- [76] WO91/01146
- [77] WO00/61761
- [78] WO01/72337

- [79] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
- [80] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [81] Ravenscroft et al. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [82] International patent application WO03/080678.
- [83] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
- [84] Frash (1990) p.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [85] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- [86] Kandil et al. (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
- [87] Berkin et al. (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
- [88] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [89] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [90] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [91] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [92] European patent 0477508.
- [93] US patent 5,306,492.
- [94] WO98/42721.
- [95] Dick et al. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [96] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [97] Kanra et al. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.
- [98] Ravenscroft et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 35-47.
- [99] WO97/00697.
- [100] WO02/00249.
- [101] Zielen et al. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- [102] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- [103] Tettelin et al. (2001) *Science* 293:498-506.
- [104] Hoskins et al (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.
- [105] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
- [106] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.
- [107] Maignani et al. (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
- [108] Mora et al. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- [109] Wismann et al. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [110] Rigden et al. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.
- [111] WO02/22167.
- [112] Ramsay et al. (2001) *Lancet* 357 (9251) : 195- 196.
- [113] Anderson (1983) *Infect Immun* 39 (1) : 233- 238.
- [114] Anderson et al. (1985) *J Clin Invest* 76 (1) : 52- 59.
- [115] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [116] EP-A-0594610.
- [117] WO02/091998.
- [118] WO99/42130
- [119] WO96/40242
- [120] Lees et al. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
- [121] WO95/08348.
- [122] US patent 4,882,317
- [123] US patent 4,695,624
- [124] Porro et al. (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s
- [125] EP-A-0208375
- [126] WO00/10599
- [127] Gevert et al. *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
- [128] US patent 4,057,685.
- [129] US patents 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [130] US patent 4,459,286.
- [131] US patent 4,965,338
- [132] US patent 4,663,160.
- [133] US patent 4,761,283
- [134] US patent 4,356,170
- [135] Lei et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- [136] WO00/38711; US patent 6,146,902.

- [137] WO02/09643.
- [138] Katia et al. (2002) *Infect Immun* 70:702-707.
- [139] WO01/52885.
- [140] European patent 0301992.
- [141] Bjune et al. (1991) *Lancet* 338 (8775) : 1093- 1096.
- [142] Fukasawa et al. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [143] WO02/09746.
- [144] Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [145] WO01/09350.
- [146] European patent 0449958.
- [147] EP-A-0996712.
- [148] EP-A-0680512.
- [149] WO02/062378.
- [150] WO99/59625.
- [151] US patent 6,180,111.
- [152] WO01/34642.
- [153] WO03/051379.
- [154] US patent 6,558,677
- [155] PCT/IB03/04293.
- [156] WO02/062380.
- [157] WO00/25811.
- [158] Peeters et al. (1996) *Vaccine* 14:1008-1015.
- [159] Vermont et al. (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.
- [160] WO01/30390.
- [161] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [162] WO03/009869.
- [163] *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867- X) .
- [164] WO90/14837.
- [165] WO02/26212.
- [166] WO98/33487.
- [167] WO00/07621.
- [168] WO99/27960.
- [169] WO98/57659.
- [170] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.
- [171] Krieg (2000) *Vaccine* 19:618-622; Krieg (2001) *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810 WO98/40100 WO98/55495, WO98/37919 and WO98/52581 *etc.*
- [172] WO99/52549.
- [173] WO01/21207.
- [174] WO01/21152.
- [175] WO00/62800.
- [176] WO00/23105.
- [177] WO99/11241.
- [178] de Lorenzo et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:2624-2630.
- [179] Nakai & Kanehisa (1991) *Proteins* 11:95-110.
- [180] Yamaguchi et al. (1988) *Cell* 53 :423-432.
- [181] <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>
- [182] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
- [183] Strutzberg et al. (1995) *Infect. Immun.* 63:3846-3850.
- [184] Legrain et al. (1993) *Gene* 130:73-80.
- [185] Loosmore et al. (1996) *Mol Microbiol* 19:575-586.
- [186] Myers et al. (1998) *Infect. Immun.* 66:4183-4192.
- [187] Schlegel et al. (2002) *J. Bacteriol.* 184:3069-3077.
- [188] Turner et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:4447-44610.
- [189] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/micr.html>
- [190] Voulhoux et al. Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference. NiPH, Oslo, page 31.
- [191] Comanducci et al. (2002) *J. Exp. Med.* 195: 1445-1454.
- [192] WO 03/010194.

- [193] Jennings et al. (2002) Eur. J. Biochem. 269:3722-3731.
 [194] Granoff et al. (1998) J. Immunol. 160:5028-5036.
 [195] Grifantini et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:914-921.
 [196] Peelers et al. (1999) Vaccine 17:2702-2712.
 [197] Massignani et al. (2003) J Exp Med 197:789-799.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO: 1- strain MC58 [WO99/57280]

MMRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLQDSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 2-strain gb185

MMRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLQDSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGKLTITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 3 - strain m4030

MMRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQDSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 4 - strain iss1001

MMRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQDSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRRFKIGDIAGENTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 5 - strain Inp17592

MMRTTFCCSLTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLQDSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDK
 VSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYY
 TIDFAVKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDGKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 6-strain f6124

MMRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQDSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 7 - strain m198172

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPGEGRATYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPENVDLAASDIKPKKRRAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAQK

SEQ ID NO: 8 - strain m2197

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPGEGRATYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPENVDLAAAYIKPDKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAQK

SEQ ID NO: 9 - strain m2937

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLRSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPGEGRATYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAQK

SEQ ID NO: 10 - strain 961-5945

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPSGKAETHGKAFSSDDAGGLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 11 - strain gb013

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPSGKAETHGKAFSSDDAGGLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 12- strain 860800

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPSGKAETHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 13 - strain 95n477

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPSGKAETHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 14 - strain m2671

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQDHSVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPSGKAETHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 15 - strain 1000

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYGNGLSLNTGKLNKVSREFD
FIHQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 16 - strain m3279

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYGNGLSLNTGKLNKVSREFD
FIHQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 17 - strain 193-4286

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAERTYGNGLSLNTGKLNKVSREFD
FIHQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 18 - strain m1239

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAETHGKAFSSDDPNGL
HYSIDFTKQGYGRIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 19 - strain 16889

MNRTAFCCFLTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAETHGKAFSSDDAGGKL
TYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 20 - strain gb355

MNRTAFCCFLTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAETHGKAFSSDDAGGKL
TYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 21- strain m3813

MNRTAFCCFLTALILTACSSGGGGSGGIAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLKND
KISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAETHGKAFSSDDAGGKLT
YTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 22 - strain ngp165

MNRTTFCCSLTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLK
NDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAETHGKAFSSDDPNGL
HYTIDFTNKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 23 - strain fa1090

MNRTTFCCLSLTAGPDSRLQQRGGGGVAAIDIGTGLADALTAPLDHDKGLKSLTLEASIPQNGTLTLSAQGAECTFKAGGKDNSLNTGKLKND
KISRFDVFQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVALRIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSDLGGEHTAFNQLPEGKAEYHGKAFSSDDAGKLT
TIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTTRYGEEKGYRLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVREIGIADKQ

SEQ ID NO: 24 - strain MC58

CSSGGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAECTYNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVD
LAAADIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTVMGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 25 ~ strain gb185

CSSGGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHDKGLQSLMLDQSVRKNEKLKLAQGAECTYNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVE
LATAYIKPDKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 26 - strain m4030

CSSGGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAECTYNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVE
LATAYIKPDKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 27 - strain iss1001

CSSGGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAECTYNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMA TYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVE
LATAYIKPDKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 28 - strain lnp17592

CSSGGGGGGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAECTYNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITL
ESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAVQGHGKIEHLKSP
ELNVDLAAAYIKPDKRRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 29 - strain f6124

CSSGGGGVAAIDIGAVLADALTAPLDHDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAECTYNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVD
LAASDIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 30 - strain m198172

CSSGGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAECTYNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVD
LAASDIKPDKRRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 31- strain m2197

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLQDSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYIDFAAQGHGKIEHLKSPENVD
LAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 32 - strain m2937

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLQDSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYIDFAAQGHGKIEHLKSPENVD
LAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 33 - strain 961-5945

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLQDSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYIDFAAQGHGKIEHLKSPENVD
AAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 34 - strain gb013

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLQDSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYIDFAAQGHGKIEHLKSPENVD
ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 35 - strain 860800

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLQDSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYIDFAAQGHGKIEHLKSPENVD
ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 36 - strain 95n477

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLQDSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYIDFAAQGHGKIEHLKSPENVD
ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 37 - strain m2671

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLQDSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYIDFAAQGHGKIEHLKSPENVD
ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 38 - strain 1000

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLSLTLQDSVRKNEKLKLAQAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLIYIDFAAQGHGKIEHLKSPENVD
ASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 39 - strain m3279

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAECTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIFRQIEVDGQTTITLASGEF
QIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVEL
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 40 - strain 193-4286

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAECTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIFRQIEVDGQTTITLASGEF
QIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVEL
ASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 41- strain m1239

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDIVQKIEVDGQT
ITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLK
TLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 42 - strain 16889

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDIVQKIEVDGQT
ITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDAGGKLTITIDFAAQGHGKIEHLK
TPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 43 - strain gb355

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDIVQKIEVDGQT
ITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDAGGKLTITIDFAAQGHGKIEHLK
TPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 44 - strain m3813

CSSGGGGSGGIAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDIVQKIEVDGQT
LASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDAGGKLTITIDFAAQGHGKIEHLK
EQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 45 - strain ngp165

CSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAECTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDIVQKIEVDGQT
ITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDPNGLHYTIDFTNKQGYGRIEHLK
TPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTTHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 46 - N-terminal sequence for expression
GPDSDRLQRRG

SEQ ID NO: 47 - PCR primer
CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

SEQ ID NO: 48 - PCR primer
CCCCTCGAGTTGCTTGCGCGCAAGGC

SEQ ID NO: 49 - PCR primer
CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

SEQ ID NO: 50 - PCR primer

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 51 - PCR primer

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGGAGGGGTGGTGTCCG

SEQ ID NO: 52 - PCR primer

GCCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 53 - PCR primer

CGCGGATCCCATATGAATCGAACTGCCTTCTGCTGCC

SEQ ID NO: 54 - PCR primer

CCCGCTCGAGTTATTGCTTGGCGGCAAGGC

SEQ ID NO: 55 - PCR primer

GACCTGCCTCATTGATG

SEQ ID NO: 56 - PCR primer

CGGTAAATTATCGTGTTCCGACGGC

SEQ ID NO: 57 - PCR primer

CAAATCGAAGTGGACGGGCAG

SEQ ID NO: 58 - PCR primer

TGTTGATTTTGCCGTTCCCTG

SEQ ID NO: 59 - PCR primer

GCTCTAGACCAGCCAGGCGCATAC

SEQ ID NO: 60 - PCR primer

TCCCCCGGGGACGGCATTGTTTACAGG

SEQ ID NO: 61 - PCR primer

TCCCCCGGGCGCCAAGCAATAACCATG

SEQ ID NO: 62 - PCR primer

CCCGCTCGAGCAGCGTATCGAACCATGC

SEQ ID NO: 63 - PCR primer

GCTCTAGATTCTTTCCCAAGAACTCTC

SEQ ID NO: 64 - PCR primer

TCCCCCGGGCCCGTATCATCCACCAC

SEQ ID NO: 65 - PCR primer

TCCCCCGGGATCCACGCAAATACCCC

SEQ ID NO: 66 - PCR primer

CCCGCTCGAGATATAAGTGGAAGACGGA

SEQ ID NO: 67 - Figure 1 sequence

LNQIVK

SEQ ID NO: 68 - Figure 1 sequence

VNRTAFCCLSLTTALILTAC

SEQ ID NO: 69 - Figure 1 sequence

AATTGAACCAATCGTCAATAACAGGTGCTGTAACAAAATGCCGTCTGAACCGCCGTCGGACGACATTTGATTTTGTCTTTGACCTGC
 CTCATTGATCGGTATGCAAAAAAGATACCATAACCAAAATGTTATATATCTATCTGCGTATGACTAGGAGTAAACCTGTGAATCGAACT
 GCCTTCTGCTGCCCTTCTCTGACCACTGCCCTGATTCTGACCGCCTGC

SEQ ID NO: 70 - Sequence which may be omitted
 TRSKP

SEQ ID NO: 71 - Sequence which may be omitted
 TRSKPV

SEQ ID NO: 72 - Sequence which may be omitted
 PSEPPFG

SEQ ID NO: 73 - Sequence which may be retained
 GGGG

SEQ ID NO: 74 - MenB putative Fur box
 CATAACCAAAATGTTTATA

SEQ ID NO: 75 - E.coli Fur-box consensus
 GATAATGATAATCATTATC

SEQ ID NO: 76 - '936' from MC58, with leader peptide processed

VSAVIGSAAVGAKSAVDRTTGAQTDNNMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLHLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNY
 TVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQR

SEQ ID NO: 77 - Example hybrid protein,

MVSAVIGSAAVGAKSAVDRTTGAQTDNNMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLHLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNY
 ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGGVAADIG
 TGLADALTAPLQHKDGLKSLTLEDSPQNGTTLTSAQGAERTFKAGDKNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQITITLASGEFQIYKQNSAV
 VALQIEKINNPKIDSLINQSFVLSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEK
 SHAVILGDTTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 78 - Sequence for expression
 GSGPDSRLQRR

SEQ ID NO: 79 - Tandem NMB1870 (MC58 & 2996)

VAADIGAGLADALTAPLQHKDGLKSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQITITLESGEFQVYKQSH
 SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQGGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
 PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAQKSGPDSRLQRRVAADIGAGLADALTAPLQHKDGLKSLT
 TLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQITITLESGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPKIDSLINQSFV
 VLSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAAQGGNGKIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTTRYGSEEGKTYHLALF
 GORAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 80 - NMB1870_{MC58} with N-terminal deletion (ΔG)

VAADIGAGLADALTAPLQHKDGLKSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQITITLESGEFQVYKQSH
 SALTAFTQTEIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQGGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
 PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAQK

SEQ ID NO: 81 - NMB1870₂₉₉₆ with N-terminal deletion (AG)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDH
SAVVALQIEKINNPDKIDSLINQSFVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDAGGKLTYYIDFAAKQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKA
DEKSHAVILGDTTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 82 - Tandem NMB1870 (MC58 & 2996)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSH
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDAGGKLTYYIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGKQAQEVAGSAEVRTVNGIRHIGLAAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVR
KNEKLLAAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQSFVSLGGG
HTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDAGGKLTYYIDFAAKQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEI
AGSATVKIGERVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 83 - Tandem NMB1870 (MC58 & M1239)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSH
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDAGGKLTYYIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGKQAQEVAGSAEVRTVNGIRHIGLAAGKQSGGSDRLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKSL
TLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTILASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQ
SFVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDPPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEGTYHL
ALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SFLVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDPPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEGTYHL
ALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 84 - NMB1870_{M1239} with N-terminal deletion (AG)

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTILASGEFQIYK
QNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQSFVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDPPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAE
LKADEKSHAVILGDTTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 85 - Tandem NMB1870 (MC58 & M1239)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSH
SALTAFTQTEIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDAGGKLTYYIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGKQAQEVAGSAEVRTVNGIRHIGLAAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKSLTLEDSIP
QNGTLTSLAQGAERTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTILASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQSFVSL
GGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDPPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 86 - Sequence for expression

GPDSDRLQRR

SEQ ID NO: 87 - Tandem NMB1870 (2996 & M1239)

GPDSDRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITL
ESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQSFVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDAGGKLTYYIDFAAKQGHGKIEHLKTPQ
ONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGSDRLQRRVAADIGTGLADALTAPL
DHDKDKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKDLSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTILASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNP
DKIDSLINQSFVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDPPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRY
GSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 88 - Tandem NMB1870 (2996 & M1239)

GPDSRLQQRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAECTYNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLES
SGEFQIYKQHSAAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQ
NVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGL
KSLTLEDSIPQNGTLTSAQGAECTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTTITLASGEFQIYKQHSAAVVALQIEKINNPKIDSLI
NQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 89 - Tandem NMB1870 (M1239 & 2996)

GPDSRLQQRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQGAECTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTI
TLASGEFQIYKQHSAAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
LEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGPDSRLQQRVAADIGAGLADALT
APLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAECTYNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQHSAAVVALQIEKINNPK
DKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRY
GSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 90 - Tandem NMB1870 (M1239 & 2996)

GPDSRLQQRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQGAECTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTI
TLASGEFQIYKQHSAAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
LEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKD
KSLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAECTYNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQHSAAVVALQIEKINNPKIDSLI
NQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGT
YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 91 - Hybrid of protein '936' band NMB1870₂₉₉₆

CVSAVIGSAAVGAASVDRRTTGAQTDNNVMAIRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLILLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNY
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRSGGGPDSRLQQR
RVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAECTYNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQD
HSAAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELK
ADEKSHAVILGDTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 92 - Hybrid of protein '936' and NMB1870₂₉₉₆

CVSAVIGSAAVGAASVDRRTTGAQTDNNVMAIRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLILLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNY
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRSGGGVAADIG
AGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAECTYNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQHSAAVVAL
QIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHA
VILGDTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 93 - Hybrid of protein '936' and NMB1870_{M1239}

CVSAVIGSAAVGAASVDRRTTGAQTDNNVMAIRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLILLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNY
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRSGGGPDSRLQQR
RVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQGAECTFKAGDKDNLNTGKLNKDKISRDFVQKIEVDGQTTITLASGEFQIY
KQHSAAVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAA
ELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 94 - Hybrid of protein '936' and NMB1870_{M1239}

CVSAVIGSAAGKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTRGYTPQISVVGYNRHLLLQGVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNY
ITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRSGGGGVAADIG
TGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQAEXTFKAGDKDNLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAV
VALQIEKINNPKTDLSLINQSRFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAETHGKRAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEK
SHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 95 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEQ ID NO: 96 - oligonucleotide primer

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 97 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

SEQ ID NO: 98 - oligonucleotide primer

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 99 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEQ ID NO: 100 - oligonucleotide primer

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 101 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

SEQ ID NO: 102 - oligonucleotide primer

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 103 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEQ ID NO: 104 - oligonucleotide primer

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 105 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

SEQ ID NO: 106 - oligonucleotide primer

CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 107 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEQ ID NO: 108 - oligonucleotide primer

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 109 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTGCG

SEQ ID NO: 110 - oligonucleotide primer

CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 111 - oligonucleotide primer

CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEQ ID NO: 112 - oligonucleotide primer
CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 113 - oligonucleotide primer
CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTCG

SEQ ID NO: 114 - oligonucleotide primer
CCCGCTCGAGCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 115 - oligonucleotide primer
CGCGGATCCGGCCCTGATTCTGACCG

SEQ ID NO: 116 - oligonucleotide primer
CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 117 - oligonucleotide primer
CGCGGATCCGGAGGGGGTGGTGTCG

SEQ ID NO: 118 - oligonucleotide primer
CCCAAGCTTCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 119 - oligonucleotide primer
CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCG

SEQ ID NO: 120 - oligonucleotide primer
CGCGGATCCCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 121 - oligonucleotide primer
CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCG

SEQ ID NO: 122 - oligonucleotide primer
CGCGGATCCCTGTTTGCCGGCGATGCC

SEQ ID NO: 123 - strain FN131217

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDSVRKNEKLKLAQAERTYGNQDGLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQYKQSHSALTALQTEQVDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPQGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYIDFA
AKQGHGKIEHLKSLNVDLAASDIKPKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 124 - strain ES14933

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDSVRKNEKLKLAQAERTYGNQDGLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQYKQSHSALTALQTEQVDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKQVMATYRGTAFGSDDAGGKLTYYIDFA
AKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 125 - strain GB0993

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDSVRKNEKLKLAQAERTYGNQDGLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQYKQSHSALTALQTEQVDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKQVMATYRGTAFGSDDAGGKLTYYIDFA
AKQGHGKIEHLKSPENVELAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 126 - strain M6190

MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKKDGLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVNGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSRKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
AKQGYGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 127 - strain F19324

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKKDGLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSRKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
AKQNGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDKRHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 128 - strain ISS1113

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKKDGLQSLTLEDISQNGTLTLSAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 129 - strain gb0345

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKKDGLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 130 - strain M0445

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKKDGLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAARQ

SEQ ID NO: 131 - strain MK82

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKKDGLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGERKVEHIGIAGKQ

SEQ ID NO: 132 - strain 8047

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGARLADALTAPLDHKKDGLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGERKVEHIGIAGKQ

SEQ ID NO: 133 - strain C4678

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKKDGLQSLTLQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPKGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFA
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGERKVEHIGIAGKQ

SEQ ID NO: 134 - strain ISS1133

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 135 - strain NG6188

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 136 - strain M0579

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 137- strain F16325

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 138 - strain gb988

MNRTTFCCSLTALILTACSSGGGGGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKDNLNTGKLNK
NDKISRFDVQKIEVDGQITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDPNGRL
HYTIDFTNKQGYGRIEHLKTPELNVDLASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 139 - strain 220173i

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA
ARQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGKA

SEQ ID NO: 140 - strain gb101

MNRTTFCCSLTALILTACSSGGGGGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTSLAQGAERTFKAGDKDNLNTGKLNK
NDKISRFDVQKIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTATYRGTAFGSDDAGGK
LYTIDFAARQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAARK

SEQ ID NO: 141- strain nge31

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSR
FDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPKIDS LINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDF
TKKQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 142 - Triple NMB1870 tandem (MC58, 2996 and m1239)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDIAGEHTSPDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVR
KNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPOKIDSINQRSFLVSGLGGE
HTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAAKQGNKIEHLKTPQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEI
AGSATVKIGIEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTTLTSAQGAERTFRAGDKNSLNTGKLNKDKI
SRFDQVQRIEVDGQITITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPOKIDSINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAIEYHGKAFSSDDFNGRLHYSI
DFTKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGIEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 143 - NadA from Hajj strains

MKHFPKVLTTAILATPCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQENGINEFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
VNEKQNVDAKVAEAEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNIKIDEXLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDET
NTKADEAVKTANEAKQTAETKQNVDAKVAEAEIAGKAAAGTANTAADKAEVAKVTDIKADIATNKNIAKKANSADVTTREESDKFVRI
DGLNATTEKLDTRLASAESITEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAG
VAVGTSSGSSAAYHVGNYEW

SEQ ID NO: 144 - glycine linker
GSGGGG

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogénica de duas proteínas que compreende (a) um adjuvante de sal de alumínio; (b) uma primeira proteína, que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 24; e (c) uma segunda proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 33; em que a proteína (b) tem menos de 70% de identidade de sequência da proteína (c).
2. Composição da reivindicação 1, em que a composição pode provocar uma resposta de anticorpo que é bactericida contra estirpes de *N. meningitidis*, em pelo menos duas das linhagens hipervirulentas ET-37, ET-5, conjunto A4, linhagem 3, subgrupo I, subgrupo III, e subgrupo IV-1.
3. Composição de qualquer reivindicação anterior, em que a primeira proteína tem pelo menos 88% de identidade com a SEQ ID N°: 24.
4. Composição de qualquer reivindicação anterior, em que a segunda proteína tem pelo menos 88% de identidade com a SEQ ID N°: 33.
5. Composição de qualquer reivindicação anterior, em que a primeira e/ou segunda proteína é/são proteínas meningocócicas.
6. Composição de qualquer reivindicação precedente, em que uma ou mais das proteínas é uma lipoproteína.
7. Composição de qualquer reivindicação precedente, em que pelo menos uma das proteínas não inclui a sequência de

aminoácidos TRSKP (SEQ ID N°: 70) ou TRSKPV (SEQ ID N°: 71) dentro de 10 aminoácidos do seu N-terminal.

8. Composição de qualquer reivindicação precedente, em que pelo menos uma das proteínas não inclui a sequência de aminoácidos PSEPPFG (SEQ ID N°: 72) dentro de 10 aminoácidos do seu N-terminal.
9. Composição de qualquer reivindicação precedente, em que pelo menos uma das proteínas inclui a sequência de aminoácidos GGGG (SEQ ID N°: 73).
10. Composição de qualquer reivindicação precedente, em que pelo menos uma das proteínas é utilizada sob a forma de uma proteína de fusão.
11. Composição da reivindicação 10, em que a proteína de fusão inclui a SEQ ID N°: 46 e/ou a sequência líder de lipoproteína *H. influenzae* P4.
12. Composição de qualquer reivindicação anterior, que compreende uma ou mais proteínas que compreendem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir da SEQ ID N°s: 1-45 e 77.
13. Composição compreendendo uma proteína híbrida de fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que:
 - (I) n é 2 ou mais;
 - L é uma sequência de aminoácido ligante opcional;
 - A é uma sequência de aminoácido N-terminal opcional;
 - B é uma sequência de aminoácidos C-terminal opcional; e
 - os grupos X incluem: (a) uma primeira proteína, que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°:

24; e (b) uma segunda proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 33; e em que a proteína (a) tem menos de 70% de identidade de sequência da proteína (b); desde que a proteína híbrida não tenha qualquer uma das seguintes sequências:

```
VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKND
KVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQGLADALTA
PLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDG
QLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAE
YHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYG
GEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHETHHHHHH
```

ou

```
VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKND
KVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIA
GEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK
PDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQMTSRKPVN
RTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLK
LAAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQI
EKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAIEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQ
GYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATV
KIREKVHEIGIAGKQHHHHHH ;
```

II), n é 2 ou mais; L é uma sequência de aminoácidos ligante; A é uma sequência de aminoácidos N-terminal opcional; B é uma sequência de aminoácidos C-terminal opcional; e os grupos X incluem: (a) uma primeira proteína, que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 24; e (b) uma segunda proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 33; e em que proteína (a) tem menos de 70% de identidade de sequência de proteína (b);

(III), n é 2 ou mais; L é uma sequência de aminoácido ligante opcional; A é uma sequência de aminoácidos N-terminal opcional; B está ausente; e os radicais X

incluem: (a) uma primeira proteína, que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 24; e (b) uma segunda proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 33; e em que a proteína (a) tem menos de 70% de identidade de sequência da proteína (b);

ou

(IV), n é 3; L é uma sequência de aminoácido ligante opcional; A é uma sequência de aminoácidos N-terminal opcional; B é uma sequência de aminoácidos C-terminal opcional; e os grupos X incluem: (a) uma primeira proteína, que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 24; e (b) uma segunda proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 33; e em que proteína (a) tem menos de 70% de identidade de sequência da proteína (b).

14. Composição de qualquer reivindicação anterior, que compreende um antigénio de *Neisseria* que não seja uma proteína NMB 1870.
15. Composição de qualquer reivindicação anterior, compreendendo uma vesícula preparada a partir de *N. meningitidis*.
16. Composição de qualquer reivindicação anterior, que compreende um antigénio de sacárido de *N. meningitidis* do serogrupo A, C, W135 e/ou Y.

17. Composição de qualquer reivindicação anterior, que compreende um antígeno de sacárido de *N. meningitidis* serogrupos A, C, W 135 e Y.
18. Composição de qualquer reivindicação anterior, que compreende um antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B.
19. Composição das reivindicações 16 a 18, em que o antígeno sacárido está/estão conjugados com uma ou mais proteínas de transporte.
20. Composição das reivindicações 16 a 19, em que o antígeno sacárido são oligossacarídeos.
21. Composição de qualquer reivindicação anterior, que compreende um antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae*.
22. Composição de qualquer uma das reivindicações 16 a 21, em que: (a) o antígeno sacárido do serogrupo A é sacarídeo modificado em que um ou mais dos grupos hidroxilo em que o sacárido nativo foi/foram substituídos por um grupo de bloqueio; ou (b) um antígeno sacárido do serogrupo A contém unidades de monossacárido n , em que n é um número inteiro de 1 a 100, e pelo menos 50% das unidades de monossacárido não tem grupos -OH em ambas as posições 3 e 4; ou (c) o sacárido do serogrupo A compreende unidades de monossacárido, em que pelo menos uma das unidades de monossacárido não tem -OH na posição 3 e não se tem -OH na posição 4.

23. Composição da reivindicação 19, em que a proteína transportadora é um toxóide de difteria, um toxóide de tétano, CRM₁₉₇, uma proteína da membrana externa de *N. meningitidis*, a proteína D de *H. influenzae*, ou proteína de superfície pneumocócica PspA.
24. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, que compreende: (i) um antigénio de sacárido de cada um dos serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*; (ii) um antigénio de sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B; e (iii) um antigénio de *Streptococcus pneumoniae*.
25. Composição de qualquer reivindicação anterior, em que a composição é estéril.
26. Composição de qualquer reivindicação anterior, em que a composição é tamponada entre pH 6 e pH 8.
27. Composição de qualquer reivindicação anterior, em que a composição é isotónica em relação aos seres humanos.
28. Composição da reivindicação 13, incluindo um adjuvante.
29. Composição de qualquer das reivindicações anteriores, incluindo um adjuvante de hidróxido de alumínio ou um adjuvante de fosfato de alumínio.
30. Composição de qualquer reivindicação anterior, em que a composição não inclui vesículas de membrana externa.
31. Composição de qualquer das reivindicações anteriores, para utilização como um medicamento.

32. Uso de uma primeira proteína e uma segunda proteína, tal como definido na reivindicação 1, e um adjuvante de sal de alumínio, no fabrico de um medicamento para a prevenção da infeção por *Neisseria* num mamífero.
33. Utilização da reivindicação 32, em que os antigénios são expressos de forma recombinante, num hospedeiro heterólogo e, em seguida, purificados.
34. Composição da reivindicação 31, ou o uso de acordo com a reivindicação 32 ou 33, em que o medicamento é administrado a um doente por injeção parentérica.
35. Composição ou utilização de acordo com a reivindicação 34, em que o medicamento é administrado por via intramuscular numa dose de 0,5 ml.
36. Ácido nucleico que codifica uma proteína híbrida conforme definida na reivindicação 13.

Figura 1

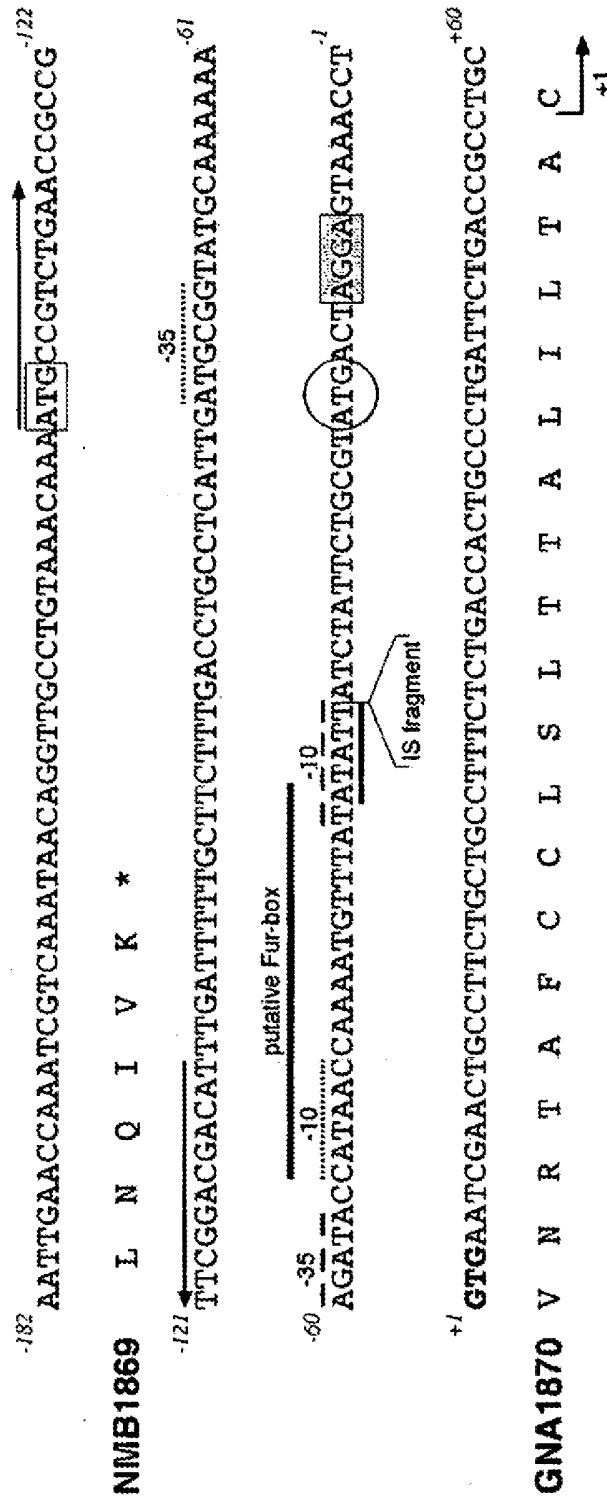


Figura 2

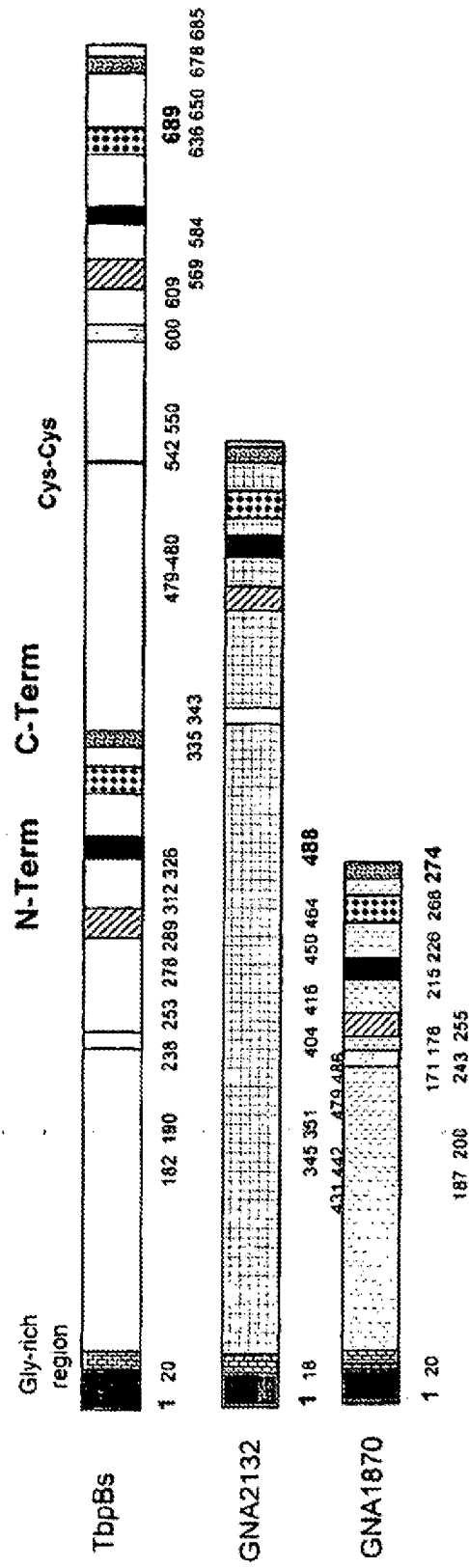


Figura 3

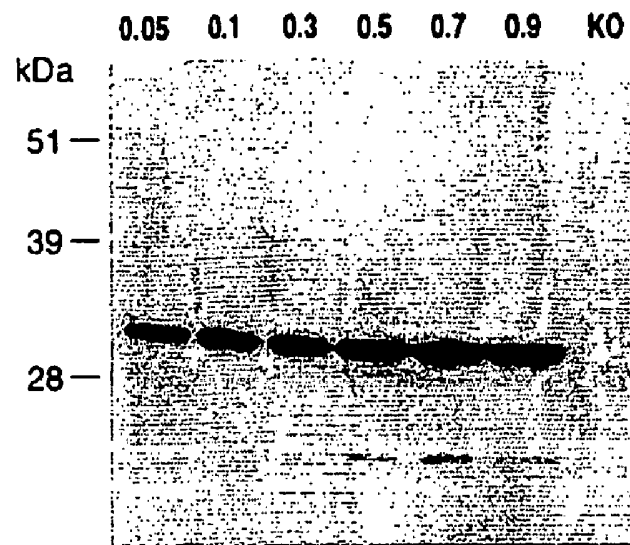


Figura 4

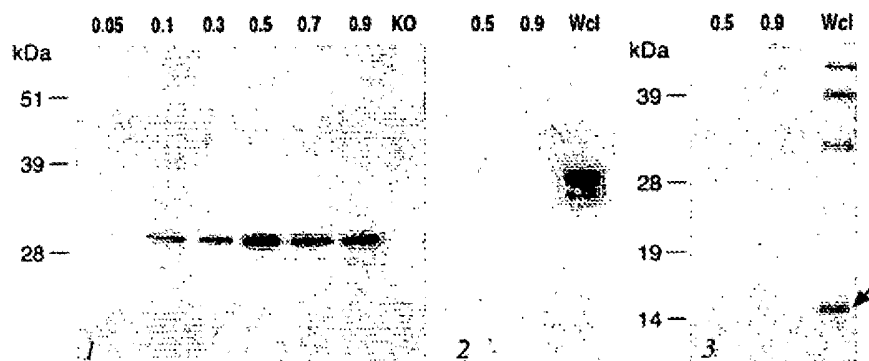


Figura 5

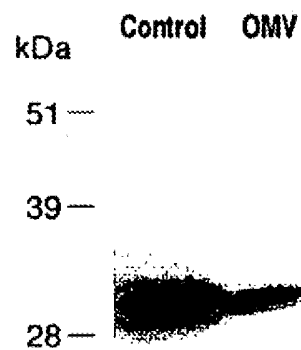


Figura 6

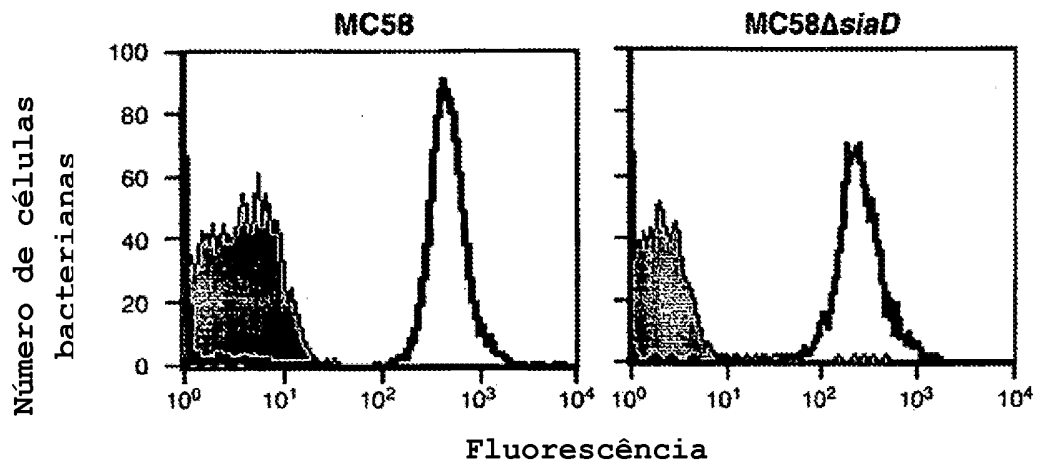


Figura 7

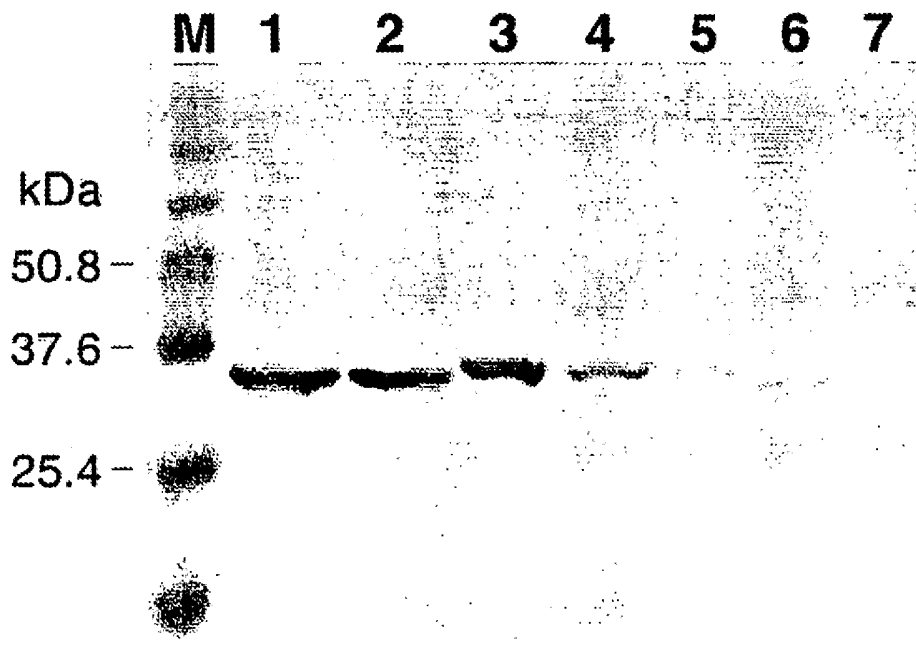


Figura 8

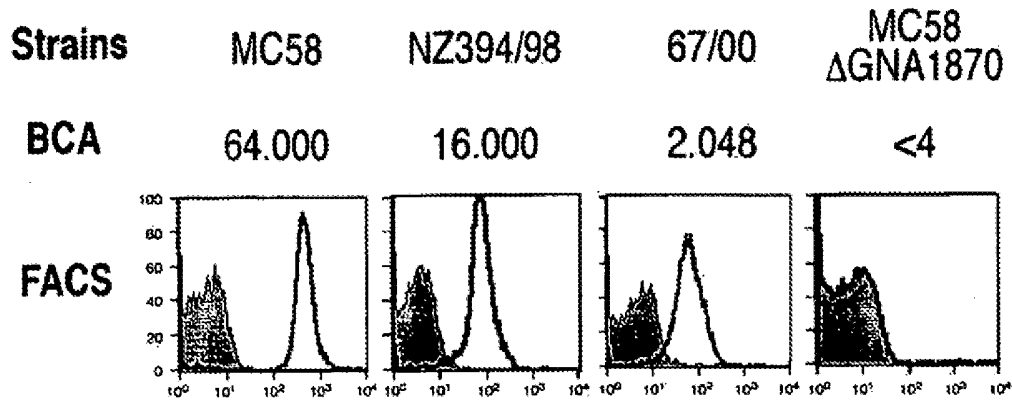


Figura 9

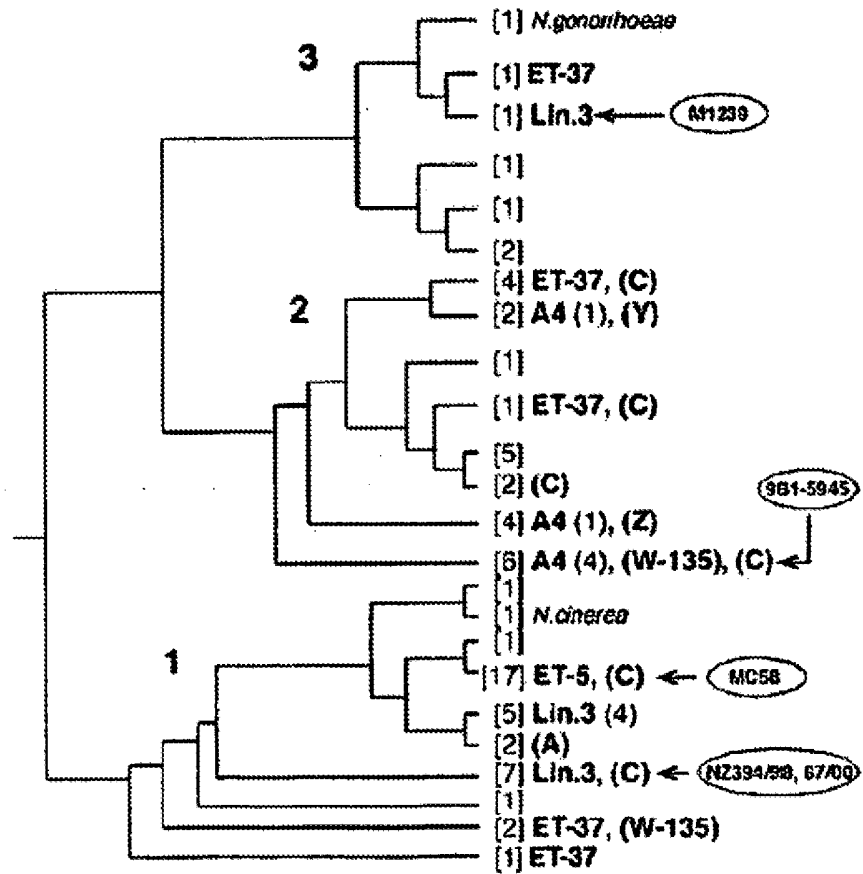


Figura 10

1

type 1 -19: VNRTAFCCSLTTALILTACS.....SGGGGVAADIGAGLADALTAPLDH: 26
type 2 -19: VNRTAFCCSLTTAALILTACS.....SGGGGVAADIGAGLADALTAPLDH: 26
type 3 -19: VNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDH: 31

type 1 27: KDKGLQSLTLDQSVRNEKLKLAQAQAEKTYGND...SLNTGKLNKDKV: 73
type 2 27: KDKSLQSLTLDQSVRNEKLKLAQAQAEKTYGND...SLNTGKLNKDKV: 73
type 3 32: KDKGLKSLTLEDSTIPONGTTLTSAQAQAEKTYKAGDKNSLNTGKLNKDKV: 81

type 1 74: SRDFFIROIEVDGQLITLESCEFOYKQSHSALTAFQTEQIODEHSGKM: 123
type 2 74: SRDFFIROIEVDGQLITLESCEFOIYKQSHSAVVALQIEKINNPKIDSL: 123
type 3 82: SRDFFIROIEVDGQITITLESCEFOIYKQSHSAVVALQIEKINNPKIDSL: 131

type 1 124: VAKRQFRFGDIAGEHTSTDKLPEGGRATYRGTAFCSDDAGGKLYTIDFA: 173
type 2 124: INQRSEFLVSGLGGEHTAFNQLP.DCKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFA: 172
type 3 132: INQRSEFLVSGLGGEHTAFNQLP.GGKAEYHGKAFSSDDPNCRLHYSIDET: 180

type 1 174: AKQGNCKIEHLKSPENVDLAAADIKPDCKRHAVISCSVLINQAEGSYIS: 223
type 2 173: AKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDRYGSSEKCTYH: 222
type 3 181: KKGCHGKIEHLKTLEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDRYGSSEKCTYH: 230

type 1 224: LGIFGCAQEVAGSAEVRTVNGIEHIGIAAKQ: 255
type 2 223: LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ: 254
type 3 231: LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ: 262

Figura 11

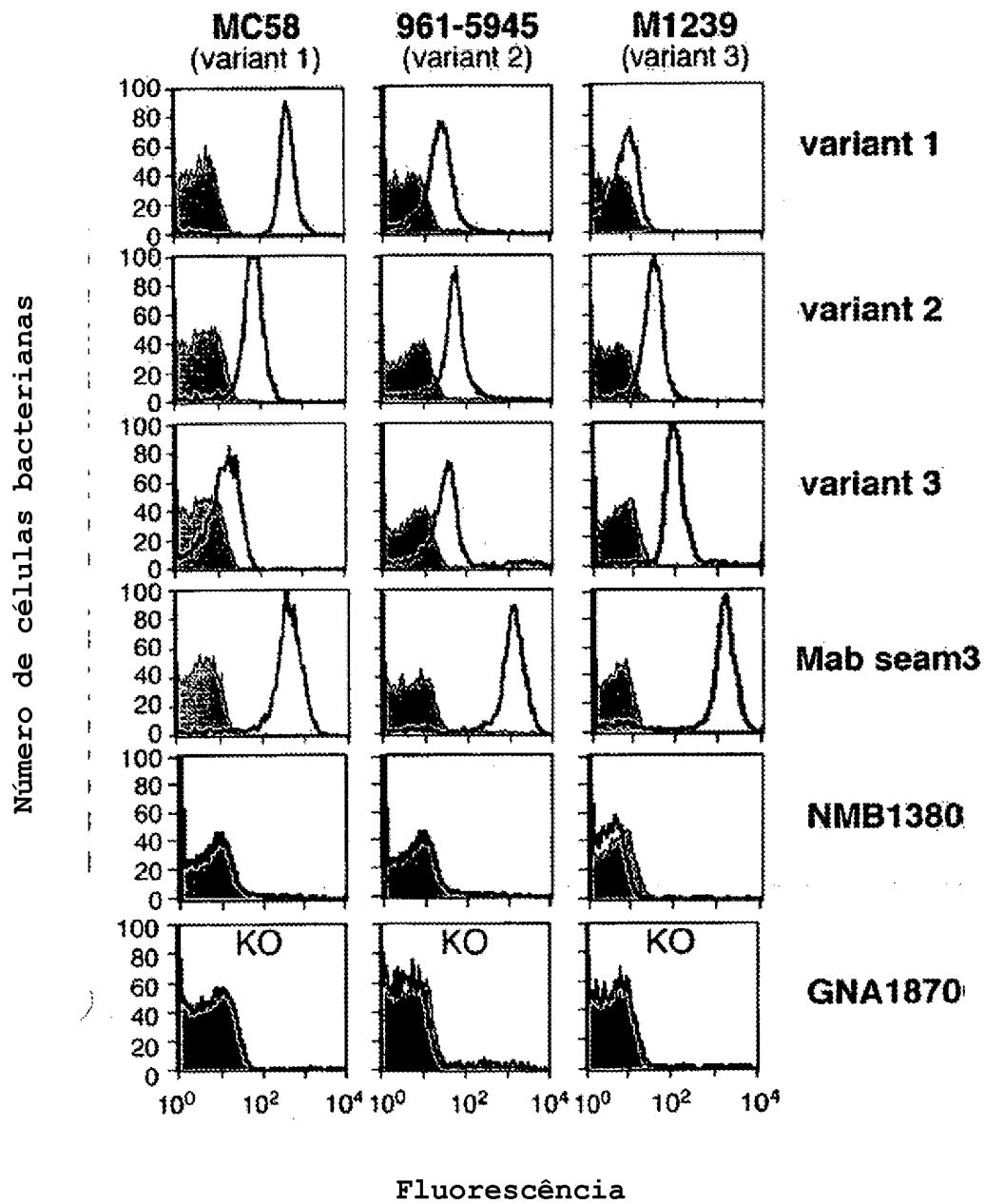


Figura 12

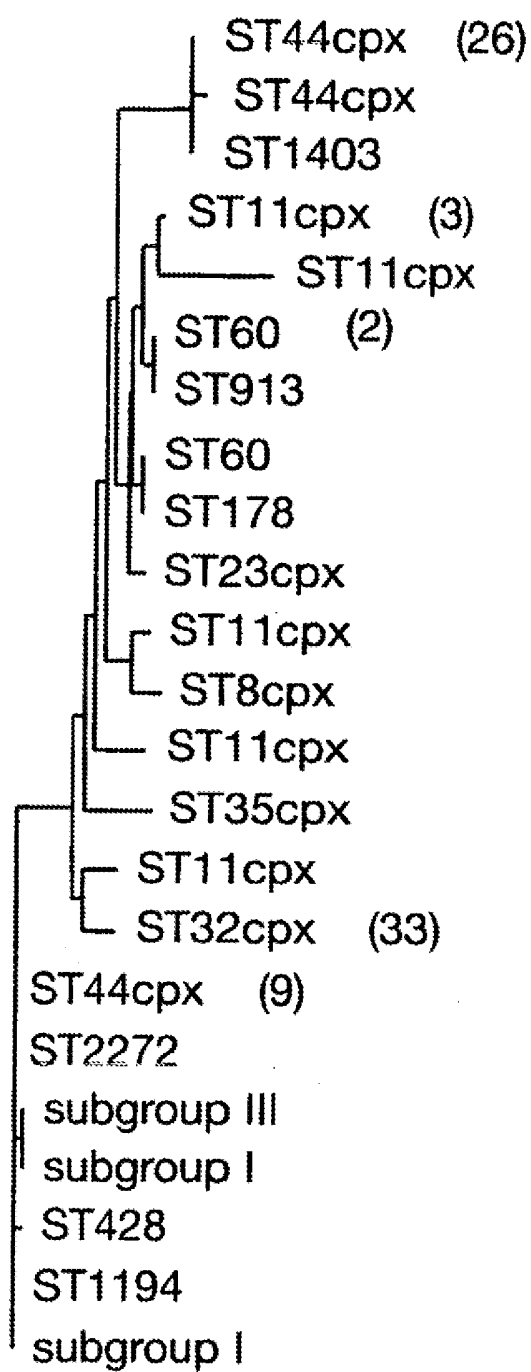


Figura 13

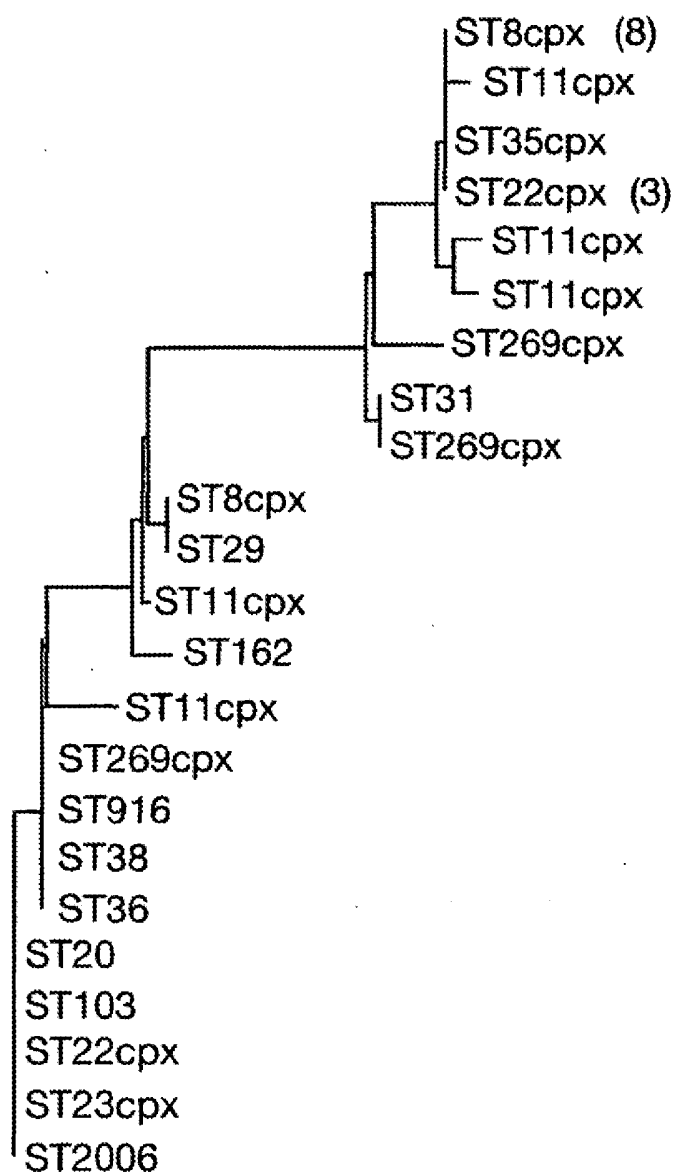


Figura 14

