

(11) Número de Publicação: **PT 1261723 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/62 (2007.10) **C07K 14/22** (2007.10)
C07K 19/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.02.28**

(30) Prioridade(s): **2000.02.28 GB 0004695**
2000.11.13 GB 0027675

(43) Data de publicação do pedido: **2002.12.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.02.20**
110/2008

(73) Titular(es):
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS
S.R.L.
VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA SI IT

(72) Inventor(es):
MARIAGRAZIA PIZZA IT
VEGA MASIGNANI IT
CESIRA GALEOTTI IT
MARIA BEATRICE ARICO IT
MAURIZIO COMANDUCCI IT

(74) Mandatário:
FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE
ATAYDE
AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **EXPRESSÕES HÍBRIDAS DE PROTEÍNAS DE NEISSERIA**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

EPÍGRAFE:	"EXPRESSÕES HÍBRIDAS DE PROTEÍNAS DE NEISSERIA"
-----------	--

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção está incluída no campo da expressão de proteínas. Em particular, refere-se à expressão heteróloga de proteínas a partir da *Neisseria* (por exemplo *N.gonorrhoeae* ou, preferivelmente, *N.meningitidis*).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os Pedidos de Patente Internacionais WO99/57280 e WO00/22430 revelam proteínas provenientes da *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Estas proteínas são tipicamente descritas como sendo expressas em *E.coli* (i.e. expressão heteróloga) quer como fusões GST N-terminais ou fusões C-terminais marcados com His, se bem que outros sistemas de expressão, incluindo expressão em *Neisseria* nativa, são também revelados.

Guillen et al., Biotecnologia aplicada, 1996, vol. 13, n.4, páginas 271-275 descreve uma proteína de fusão da *Neisseria* P.1.15 com a proteína P64K e a sua expressão em *E.coli*.

É um objecto da presente invenção fornecer tentativas alternativas e aperfeiçoadas para a expressão heteróloga dessas proteínas. Estas tentativas afectarão, tipicamente, o nível de expressão, a facilidade de purificação, a localização celular da expressão, e/ou as propriedades imunológicas da proteína expressa.

EXPOSIÇÃO DA INVENÇÃO

De acordo com a invenção, duas proteínas da neisseria são expressas como uma única proteína híbrida. É preferível que não seja utilizado nenhum parceiro de fusão não-*Neisseria* (e.g. GST ou poli-His).

Isto oferece duas vantagens. Primeiro, uma proteína que pode ser instável ou fracamente expressa por si mesma pode ser auxiliada adicionando um parceiro híbrido adequado que ultrapassa o problema. Em segundo lugar, o fabrico comercial é simplificado - apenas necessitam de ser utilizadas uma expressão e uma purificação para produzir duas proteínas separadamente úteis.

Assim, a invenção fornece uma proteína híbrida com a fórmula $\text{NH}_2\text{-A-B-COOH}$, na qual A compreende a proteína da *Neisseria* ΔG287 e B compreende a proteína de *Neisseria* 953, e na qual a sequência de aminoácidos da proteína híbrida é como revelado na SEQ ID NO:6 ou é uma sequência que possui identidade de sequência com a mesma superior a 70%.

As proteínas são preferivelmente provenientes da estirpe 2996 ou da estirpe 394/98.

Preferivelmente, as proteínas constituintes (A e B), numa proteína híbrida, de acordo com a invenção, serão provenientes da mesma estirpe.

As proteínas fundidas na híbrida podem ser directamente ligadas, ou podem ser ligadas através dum péptido linker, e.g., através dum linker poli-glicina (i.e., G_n , em que $n=3,4,5,6,7,8,8,10$ ou mais) ou através duma sequência de péptidos reduzida que facilita a clonagem. Evidentemente que é preferível não juntar uma proteína ΔG ao terminal C de um linker poli-glicina.

As proteínas fundidas podem ter falta de péptidos líderes nativos ou podem incluir a sequência peptídica líder do parceiro de fusão N-terminal.

Hospedeiro

É preferível utilizar um hospedeiro heterólogo. O hospedeiro heterólogo pode ser procariótico ou eucariótico. É preferível a *E.coli*, mas outros hospedeiros adequados inclui *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinérea*, *Mycobacteria* (e.g. *M.tuberculosis*), levedura, etc.

Sequências

A invenção fornece também uma proteína com uma identidade de sequência COM a proteína SEQ ID N°.6. Como acima descrito, o grau da "identidade de sequência" é preferivelmente maior que 70% (e.g., 80%, 90%, 95%, 99% ou mais).

O grau da "identidade de sequência" é preferivelmente determinado pelo algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman, como implementado no programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando uma pesquisa de intervalo afim com parâmetros *gap open penalty=12* e *gap extension penalty=1*. Tipicamente, 50% de identidade ou mais entre duas proteínas é considerado uma indicação da equivalência funcional.

As proteínas da invenção são encontradas no serogrupo B da *N.meningitidis*.

As proteínas preferidas da invenção são as do serogrupo B da estirpe 2996 da *N.meningitidis* (Pettersen e tal. Intect. Immun. 1993, 61(11):4724-4733) ou estirpe 394/98 (uma estirpe da Nova Zelândia) (Martin e tal. JID, 1998, 177:447-500). A menos que constatado de outra forma, as proteínas mencionadas aqui são provenientes da estirpe 2996 da *N.meningitidis*. Contudo, será apreciado que a invenção não é, em geral, limitada pela estirpe.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras da 1 à 6 mostram proteínas híbridas aqui descritas.

FORMAS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Exemplo 1 - híbridos de ΔG287

Descobriu-se que a deleção da sequência de (Gly)₆ em 287 tinha um efeito dramático na expressão da proteína. A proteína sem os aminoácidos N-terminal acima da GGGGGG é designada "ΔG287". Na estirpe MC58, a sua sequência básica (péptido líder sublinhado) é:

```
SPDVKS ADTLSKPAAP VVSEKETEAK EDAPQAGSQG QGAPSAQGSQ DMAAVSEENT
GNCGAVTADN PKNEDEVAQN DMPQNAAGTD SSTPNHTPDP NMLAGNMENQ ATDAGESSQP
ANQFDMANAA DGMQGGDDPSA GGQNAAGNTAA QGANQAGNNQ AAGSSDPIPA SNPAPANGGS
NEGRVDLANG VLIDGPSQNI TLTHCKGDSC SGNNFLDEEV QLKSEFEKLS DADKISNYKK
DGKNDKFVGL VADSVQMKGI NQYIIFYKPK PTFARFRRS ARSRRLPAE MPLIPVNQAD
TLIVDGEAVS LTGHSGNIFA PEGNYRYLTY GAEKLPGGSY ALRVQGEPAK GEMLAGAAVY
NGEVLHFHTE NGRFYPTRGR FAAKVDGFSK SVDGIIDSGD DLHMGTOKEK AAIDGNGFKG
TWTENGSGDV SGKFYGPAGE EVAGKYSYRP TDAEKGGEV FAGKKEQD*
```

ΔG287, com ou sem marcador His ("ΔG287-His" e "ΔG287K", respectivamente), são expressos a níveis muitos bons em comparação com o "287-His" ou "287^{não marcado}".

Com base nos dados de variabilidade dos genes, os variantes de ΔG287-His foram expressos em *E.coli* a partir de várias estirpes MenB, em particular a partir das estirpes 2996, MC58, 1000, e BZ232. Os resultados também foram bons - cada um deu títulos ELISA elevados e também títulos de bactericidas de serum >8192. ΔG287K, expresso a partir de Pet-24b, deu excelentes títulos nos ensaios ELISA e de soro bactericida.

A deleção das sequências poli-Gly é também aplicável ao Tbp2 (NMB0460), 741 8nmb 1870), e 893 8NMB 1969). Quando clonado no vector pET e expresso em *E.coli* sem a sequência codificante para os péptidos líderes e sem poli-Gly (i.e.,

como "formas ΔG "), foi verificado o mesmo efeito - a expressão foi boa nos clones possuindo a deleção do estiramento poliglicina, e fraca ou ausente se as glicinas estão presentes na proteína expressa.

$\Delta G287$ foi fundido directamente in-frame a montante de 919, 953, 961 (sequências abaixo representadas) e ORF46.1:

$\Delta G287-919$

```
ATGGCTAGCCCGGATGTTAAATCGGCGGACACGCTGTCAAAACCGGCGGCTCCTGTTGTTGCTGAAAAGAGACAGAG
GTAAAAGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGCGCATCCACACAAGGCAGCCAAGATATGGCGGCA
GTTTCGGCAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAACAACGGACAACCCAAAAATGAAGACGAGGGACCGCAAAAT
GATATGCCGCAAAATTCGGCCGAATCCGCAAAATCAAACAGGGAACAACCAACCCGCGGATTCTTCAGATTCCGCCGCC
CGCTCAAACCTGCGACCTGCGAATGGCGGTAGCAATTTTGGAAAGGTTGATTGGCTAATGGCGTTTGTATTGATGGG
CCGTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCTGTAAATGGTGATAATTTATTGGATGAAGAAGCACCG
TCAAAATCAGAATTTGAAAATTTAAATGAGTCTGAACGAATTGAGAAATATAAGAAAGATGGGAAAAGCGATAATTT
ACTAAATTTGGTTGCGACAGCAGTTCAAGCTAATGGAACTAACAAATATGTCATCATTTATAAGACAAAGTCCGCTTCA
TCTTCATCTGCGCGATTACAGGCGTTCTGCACGGTCGAGGAGGTCGCTTCCTGCGGAGATGCCGTAATCCCGGTCAAT
CAGGCGGATACGCTGATTGTGATGGGGAAGCGGTGAGCCTGACGGGGCATTCCGGCAATATCTTCGCGCCGAAGGG
AATTACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTGCCCGGCGGATCGTATGCCCTCCGTGTGCAAGGCGAACCGGCA
AAAGCGGAAATGCTTGGTGGCACGGCCGTGTACAACGGCGAAGTGTGCAATTTTCATACGGAAAACGGCCGTCCGTAC
CCGACTAGAGGCGAGTTTGC CGCAAAAGTCGATTTCGGCAGCAAAATCTGTGGACGGCATTATCGACAGCGGCGATGAT
TTGCATATGGGTACGCAAAAATCAAAGCGCCATCGATGGAACGGCTTTAAGGGGACTTGGACGAAAAATGGCGGC
GGGATGTTTCGGGAAGGTTTACGGCCCGCGCGGAGGAAGTGGCGGGAAATACAGCTATCGCCCGACAGATGCG
```

```
GAAAAGGGCGGATTTCGGCGTGTTCGCCGCAAAAAGAGCAGGATGGATCGGAGGAGGAGGATGCCAAAGCAAGAGC
ATCCAAACCTTTCGCCAACCAGACACATCCGTCATCAACGGCCCGGACCGCGCGGTTCGGCATCCCCGACCCCGCCGA
ACGACGTCGCGCGCGCGCGCGTCTATACCGTGTACCCGACCTGTCCCTGCCCCACTGGCGCGCGCAGGATTTTC
GCCAAAAGCCTGCAATCCTTCCGCTCGGCTGCGCAATTTGAAAAACCGCCAAGGCTGGCAGGATGTGTGCGCCCAA
GCCTTTCAAACCCCGTCCATTCCTTTACGGCAAAACAGTTTTCGAAACGCTATTTCACGCGGTGGCAGGTTGCAGGC
AACGGAAGCCTTTCGGGTACGGTTACCGGCTATTACGAGCCGGTGTGTAAGGGCGACGACAGGCGGACGCGCACAGCC
CGCTTCCCGATTACGGTATTCGCGACGATTTTATCTCCGTCGCCCTGCCCTGCGGTTTTCGGAGCGGAAAAAGCCCTT
GTCCGCATCAGGCAGACGGGAAAAACAGCGGCACAATCGACAATACCGGCGGCACACATACCGCCGACCTCTCCCGA
TTCCCATCATCCGCGCGCGCACAAACGGCAATCAAAGGCAGGTTTGAAGGAAGCCGCTTCCTCCCTTACCACACCGGCAAC
CAAATCAACGGCGCGCGCTTACGGCAAAAGCCCGGATCTCGGTTACGCGGAAGACCCCGTCAACTTTTTCATG
CACATCAAGGCTCGGCGCGTCTGAAAAACCCCGTCCGGCAAAATACATCCGCATCGGCTATGCCGACAAAAACGAACAT
CCCTACGTTTCATCGGACGCTATATGGCGGACAAAGGCTACCTCAAGCTCGGGCAGACCTCGATGCAGGGCATCAAA
GCCTATATGCGGCAAAATCCGCAACGCTCGCGGAAGTTTGGGTCAAAACCCAGCTATATCTTTTCGCGGAGCCT
GCCGGAAGCAGCAATGACGGTCCCGTCCGCGCACTGGGCACGCCGTTGATGGGGGAATATGCCGCGCAGTCCAGCCG
CACTACATTACCTTGGGCGCGCGCTTATTTGTCGCCACCCCATCCGCTTACCGCAAAAGCCCTCAACCGCTGATT
ATGGCGCAGGATACCGCAGCGCGATTAAAGGCGCGGTGCGCGTGGATTATTTTGGGGATACGGCGACGAAGCCGGC
GAACCTGCGCGCAACAGAAAAACACGGGTTACGTCCTGCGAGCTCTACCAACGGTATGAAGCCGAATACCGCCCG
TAACTCGAG
```

1	MASPDVKEAD	TLSPKPAFVV	AEKETEVKED	APQAGSQQQG	APSTQGSQDM
51	AAVSAENTGN	GGAAATDKPK	NEDEGPFQNDM	FQNSAESANQ	TGNMQPADSS
101	DSAPASNPAF	ANGGSNFRGV	DLANGVLIDG	PSQNTLTHC	KGDSNCGDNL
151	LDDEAPSKSE	FENLNESERI	EKYKIDGKSD	KFTNLVATAV	QANGTNKYVI
201	IYKDKSASS	SARPRRSARS	RRSLPAEMPL	IPVNQADTLI	VDGEAVSLTG
251	HSGNIFAFEG	NYRYLTYGAE	KLPGGSYALR	VQGEPAKGEM	LAGTAVYNGE
301	VLHFHTENGR	PYPTRGRFAA	KVDFGSKSVD	GIIDSGDDLH	MGTQKPKAAI
351	DGNFGKGTWT	ENGGGDUVGR	FYGPAGEEVA	GKYSYRPTDA	ERGGFGVFAG
401	RKEQDGSGGG	GCQSKSIQTF	PQPDTSVING	PDRPVGIPDP	AGTTVGGGGA
451	VYTVVPHLSL	PHWAAQDFAK	SLQSFRLGCA	NLKNRQGWQD	VCAQAFQTFV
501	HSPQAKQFFE	RYFTPWQVAG	NGSLAGTVTG	YYEPVLKGGD	RRTAQARFPI
551	YGIPTDFISV	PLPAGLRSGK	ALVRIRQTKK	NSGTIDNTGG	THTADLSRFP
601	ITARTTAIRK	RFEGRFLPY	HTRNQINGGA	LDGKAPILGY	AEDPVELFFM
651	HIQSGSRLKT	PSGKYIRIGY	ADKNEHPYVS	IGRYMADKGY	LKLGQTSMQG
701	IKAYMRQNPQ	RLAEVLQGNP	SYIFPRELAG	SSNDGPV GAL	GTPLMGEYAG
751	AVDRHYITLG	APLFVATAHP	VTRKALNRLI	MAQDTGSAIK	GAVRVDYFWG
801	YGDEAGELAG	KQRTTGYYVWQ	LLPNGMKPEY	RP*	

AG287-953

ATGGCTAGCCCGGATGTTAAATCGGCGGACACGCTGTCAAAACCGGCCGCTCCTGTTGTTGCTGAAAAAGAGACAGAG
GTAAAAGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGGCCATCCACACAAGGCAGCCAGATATGGCGGCA
GTTTCGGCAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAACAACGGACAACCCAAAAATGAAGACGAGGGACCGCAAAAT
GATATGCGCGCAAAATTCGCGCGAATCCGCAAAATCAAAACAGGGAACAACCAACCGCGGATTCCTCAGATTCCGCCCC
GCGTCAAAACCCCTGCACCTGCGAATGGCGGTAGCAATTTTGAAGGGTTGATTGGCTAATGGCGTTTGTATGATGGG
CCGTGCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCTTGAATGGTGATAATTTATTGGATGAAGAAGCACCG
TCAAAATCAGAAATTTGAAATTTAAATGAGTCTGAACGAATGAGAAATATAAGAAAGATGGGAAAAGCGATAAATTT
ACTAATTTGGTTGCGACAGCAGTTCAAGCTAATGGAACATAACAAATATGTCATCATTTTATAAAGACAAGTCCGCTTCA
TCTTCATCTGCGGATTCAGGCGTTCTGCACGGTCGAGGAGGTCGCTTCCTGCGGAGATGCCGCTAATCCCGTCAAT
CAGGCGGATACGCTGATTCTCGATGGGGAACGCGTCAGCCTGACGGGGCATTCCGGCAATATCTCGCGCCCGAAGGG
AATTACCGGTATCTGACTTACGGGCGGAAAATTTGCCCGGGATCGTATGCCCTCCGTGTGCAAGGCGAACCGGCA
AAAGGCGAAATGCTTGCCTGGCAGCGCCGTGTACAACGGCGAAGTGTGCTATTTTCATACGGAACCGGCGTCCGTAC
CCGACTAGAGGCGAGTTTCCCGCAAAAGTCGATTTCGCGAGCAATCTGTGGACGGCATTTATCGACAGCGCGGATGAT
TTGCATATGGGTACGCAAAATTTCAAAGCCGCCATCGATGGAAACCGGCTTTAAGGGGACTTGGACGGAATGGCGGC
GGGATGTTTCCGGAAGGTTTACGCCCCGCGCGGAGGAAAGTGGCGGAAAATACAGCTATCGCCCCGACAGATGCG
GAAAAGGCGGATTCGGCGTGTTCGCGGCAAAAAGAGCAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGAGCCACCTACAAAGTG
GACGAATATCACGCCAACGCCCTTCGCCATCGACATTTCAACACCAGCACCAACGTCGGCGGTTTTCAGGCTCTG
ACCGGTTCCGTCGAGTTTCGACCAAGCAAAACCGGACGGTAAATCGACATCAACATCCCGTTGCCAACCTGCAAAAGC
GGTTCGCAACACTTTACCGACACCTGAAATCAGCCGACATCTTCGATGCCGCCCAATATCCGGACATCCGCTTTGTT
TCCACCAAAATTCAACTTCACCGGCAAAAAGTGGTTTCCGTTGACGGCAACCTGACCATGCACGGCAAAACCGCCCC
GTCAAACTCAAAGCCGAAAATTTCAACTGCTACCAAGCCCGATGGCGAAAACCGAAGTTTGGCGCGGCGACTTCAGC
ACCACCATCGACCGCACCAATGGGCGTGGACTACCTCGTTAACGTTGGTATGACCAAAAGCGTCCGCATCGACATC
CAAATCGAGGCAGCCAAACAATAACTCGAG

1	MASPDVKSAD	TLSPAPV	AEKETEVKED	APQAGSQGG	APSTQGSQDM
51	AAVSAENTGN	GGAATTDKPK	NEDEGPQNDM	PQNSAESANQ	TGNNQPADSS
101	DSAPASNPAF	ANGGSNFGKV	DLANGVLIDG	PSQNTLTHC	KGDSNGDNL
151	LDEEAPSKSE	FENLNESEI	EKYKDGKSD	KPTNLVATV	QANGTNKYVI

201	IYKDSASSS	SARFRRSARS	RRSLPAEMFL	IPVNQADTLI	VDGEAVSLTG
251	HSGNIFAPBG	NYRYLYTGAE	KLPQGSYALR	VQGEPAKGM	LAGTAVYNGE
301	VLHFTENG	PYPTRGRFAA	KVDFGSKSVD	GIIDSGDDLH	MGTQKFKAAI
351	DGNGFKGTWT	ENGSGDVSGR	FYGPAGEEVA	GRYSYRPTDA	EKGFGVVFAG
401	KREQDSSGGG	GATYKVDEYH	ANARFAIDHF	NTSTNVGGFY	GLTGSVEFDQ
451	AKRDGKIDIT	IPVANLQSGS	QHFTDHLKSA	DIFDAAQYPD	IRFVSTKFNF
501	NGKKLVSDG	NLTMHGKTAP	VKLRAEKFN	YQSPMAKTEV	CGGDFSTTID
551	RTKWGVVYLV	NVGMTKSVRI	DIQIEAAKQ*		

AG287-961

ATGGCTAGCCCCGATGTTAAATCGGCGGACACGCTGTCAAAACCGGCGCTCCTGTTGTTGCTGAAAAAGAGACAGAG
 GTAAAGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGCGCCATCCACACAAGGCAGCCAAGATATGGCGGCA
 GTTTCGGCAGAAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAACAACCGGACAAACCCAAAAATGAAGACGAGGGACCGCAAAAT
 GATATGCGCGCAAAATTCGCGCAATCCGCAAAATCAAAACAGGGAACAACCAACCCCGGATTCCTTCAGATTCCGCCCCC
 GCGTCAAAACCTGCACCTGCGAATGGCGGTAGCAATTTTGGAAAGGGTTGATTGGCTAATGCGCTTTGATTGATGGG
 CCGTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCTTGTATGGTGATAATTTATTTGGATGAAGAAGCACCG
 TCAAAATCAGAATTGAAAAATTTAAATGAGTCTGAACGAATTGAGAAATATAAGAAAGATGGGAAAAGCGATAAATTT
 ACTAATTTGGTTGCGACAGCAGTTCAAGCTAATGGAACATAACAAATATGTCATCATTTATTAAGACAAGTCCGCTTCA
 TCTTCATCTGCGCGATTTCAGGCGTTCTGACCGGTGAGGAGGTGCTTCTGCGGAGATGCGCTAATCCCCCGTCAAT
 CAGGCGGATACGCTGATTGTGATGGGGAAGCGGTGAGCTGACGGGGCATTCCGGCAATATCTTCGCGCCCCGAGGG
 AATTACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTCGCCGCGGATGCTATGCCCTCCGTGTGCAAGGCGAACCGGCA
 AAAGGCGAAATGCTGCTGGCAGCGCGCTGTACAAACCGCGAAGTGTGCTGCTTTTCATACGGAAAACCGCGCTCCGTAC
 CCGACTAGAGGCGAGTTTGGCGCAAAAGTCGATTTCCGCGAGCAATCTGTGGACGGCATTATCGACAGCGCGGATGAT
 TTGCATATGGGTACCGCAAAATTTCAAGCGCGCATTCGATGGAAACCGCTTTAAGGGGACTTGGACCGGAAATGCGCGC
 GGGGATGTTTCCGGAAGGTTTACGGCCCCCGCGCGGAGGAGTGGCGGAAAAATACAGCTATCGCCCCGACAGATGCG
 GAAAAAGGCGGATTCGGCGCTGTTTGGCGGCAAAAGAGCAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGAGCCACAAACGACGAC
 GATGTTAAAAAGCTGCCACTGTGGCCATTCGCTGCTGCTTACAACAATGGCCAAAGAAATCAACGGTTTCAAGCTGGA
 GAGACCATCTACGACTTGTGAAGACGGCACAATTCACAAAAAGAGCGCAACTGCGAGCCGATGTTGAAGCCGACGAC
 TTTAAAGGCTCTGGGTCTGAAAAAGTCTGACTAACCCTGACCAAAACCGTCAATGAAAAACAACAACAGCTCGATGCC
 AAAGTAAAGCTGCAGAAATCTGAAATAGAAAAGTTAACAACCAAGTTAGCAGACACTGATGCCGCTTTAGCAGATACT
 GATGCCGCTCTGGATGCAACCACCAACGCTTGAATAAATTTGGGAGAAAATATAACGACATTTGCTGAAGAGACTAAG
 ACAATATCGTAAAAATTTGATGAAAAATTAGAAGCGGTGGCTGATACCGTCGACAAGCATGCCGAAGCATTCAACGAT
 ATCGCCCGATTCATTTGGATGAAACCAACACTAAGGCGAGCAGCAAGCCGTCAAAAACCGCAATGAAGCCAAACAGACGCGC
 GAAGAAACCAACAAAAACGTCGATGCCAAAGTAAAGCTGCAGAAACTGCGAGGCAAGCCGAAGCTGCGCGCTGGC
 ACAGCTAATACTGAGCCGACAAGGCGCAAGCTGTGCTGCAAAAAGTTACCGACATCAAAGCTGATATCGCTACGAAC
 AAAGATAATATTGCTAAAAAGCAACAGTGCAGCGCTGTACACCAGAGAAGAGTCTGACAGCAAAATTTGTCAGAAAT
 GATGGTCTGGAAGCTTACTACCGAAAAATTTGACACACGCTTGGCTTCTGCTGAAAAATCCATTTGCCGATCACGATACT
 CGCCTGAACGCTTTGGATAAAACAGTGTGACAGCTGCGCAAGAAACCGCCAAAGGCTTGCAGAACAGCCGCGCTC
 TCCGCTCTGTTCCAACTTACACGTTGGTTCGCTTCAATGTAACGGCTGCAGTCCGCGGTACAAATCGAATCGGCA
 GTCGCCATCGGTACCGGCTTCCGCTTTACCGAAACCTTTGCGCCAAAGCAGGCGTGGCAGTCCGCGCTTCTGCTCGGT
 TCTTCCGCGACCTACCATGTGCGCGCTCAATTACGAGTGGTAACCTCGAG

1	MASPDVKSAD	TLSPAPFV	AEKTEVKED	APQAGSQGG	APSTQGSQDM
51	AAVSAENTGN	GGAATTDRPK	NEDEGPQNDM	PQNSAESANQ	TGNNQPADSS
101	DSAPASNPAF	ANGSNFGRV	DLANGVLIDG	PSQNTILTHC	KGDSCNGDNL
151	LDEEAPSKSE	FENLNERI	EKYKDKSD	KFTNLVATAV	QANGTNKYVI
201	IYKDKSASS	SARFRSARS	RRSLPAEMPL	IPVQADTLI	VDGEAVSLTG
251	HSGNIFAPEG	NYRYLTYGAE	KLPGGSYALR	VQGEPAKGEM	LACTAVYNGE
301	VLHFHTENGR	PYPTRGRFAA	KVDFGSKSVD	GIIDSGDDLH	MGTQKFKAAI
351	DGNFGKGTWT	ENGGGDIVSGR	FYGPAGEEVA	GKYSYRPTDA	EKGGFVGFAG
401	KKEQDGSGGG	GATNDDVVKK	AATVAIAAAY	NNGQEINGFK	AGETIYDIDE
451	DGTITKKDAT	AADVEADDFK	GLGLEKVVVN	LTKTVNENKQ	NVDAKVKAAE
501	SEIERLTKKL	ADTDAALADP	DAALDATINA	LNKLGENITT	PAEETKTNIV
551	KIDEKLEAVA	DTVDKHAEP	NDIADSLDET	NTRADEAVKT	ANEAKQTAE
601	TKQNVDAKVK	AAETAAGKAE	AAAGTANTAA	DKAEVAARKV	TDIKADIATN
651	KDNIARKANS	ADVTYREESD	SKFVRIDGLN	ATTEKLDTRL	ASAEKSIADH
701	DTRLNGLDKT	VSDLRKETRQ	GLAEQAALSG	LFQPINVGRF	NVTAAVGGYK
751	SESAVAITGT	FRPTENFAAK	AGVAVGTSSG	SSAAYHGVN	YEW*

	ELISA	Bactericida
AG287-953-His	3834	65536
AG287-961-His	108627	65536

Foi comparada a eficácia bactericida (estirpe homóloga) dos anticorpos criados contra as proteínas híbridas com anticorpos criados contra misturas simples dos antígenos componentes (utilizando 287-GST) para 919 e ORF46.1:

	Mistura com 287	Híbrido com ΔG287
919	32000	128000
ORF46.1	128	16000

Foram também obtidos dados referentes à actividade bactericida contra as estirpes MenB e contra os serotipos A e C:

	919		ORF46.1	
Estirpe	Mistura	Híbrida	Mistura	Híbrida
NGH38	1024	32000	-	16384
MC58	512	8192	-	512
BZ232	512	512	-	-
MenA (F6124)	512	32000	-	8192
MenC (C11)	>2048	>2048	-	-
MenC (BZ133)	>4096	6400	-	8192

As proteínas híbridas com ΔG287 no terminal-N são, portanto, imunologicamente superiores às misturas simples, sendo ΔG287-ORF46.1 particularmente eficazes, embora contra estirpes heterólogas. A ΔG287-ORF46.1K pode ser expressa em Pet-24b.

Foram fabricadas as mesmas proteínas híbridas utilizando a estirpe New Zealand 394/98 em vez da 2996:

ΔG287N2-919

ATGGCTAGCCCCGATGTCAAGTCGGCGGACACGCTGTCAAAACCTGCCGCCCTGTGTGTTCTGAAAAAGAGACAGAG
GCAAAGGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGCGCCATCCGCACAAGGCGGTCAAGATATGCGGGCG
GTTTCGGAAGAAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAGCAACGGACAAACCCAAAAATGAAGACGAGGGGGCCAAAAAT
GATATGCCGCAAAATGCGCGCGATACAGATAGTTTACACCGAATCACACCCCGGCTTCGAATATGCGGGCGGAAAT
ATGGAARACCAAGCACCGGATGCCGGGAATCGGAGCAGCGCGCAACCAACCGGATATGGCAAATACGGCGGACCGGA
ATGCAGGCGTACGATCCGTCGCGCAGGCGGGGAAATGCGCGCAATACGGCTGCCCAAGGTACAAATCAAGCCGAAAC
AATCAACCGCGGTTCTCAAAATCCTGCCCTCTTCAACCAATCCTAGCGCCACGAATAGCGGTGGTGATTTTGAAGG
ACGAACGTGGGCAATCTGTGTGATTGACGGGCGCTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATCTTGT
AGTGGCAATAATTTCTTGGATGAAGAAGTACAGCTAAAAATCAGAAATTTGAAAAATTAAGTGATGCAGACAAATPAGT
AATTACAAGAAAGATGGGAAGAATGACGGGAAGAATGATAAATTTGTCGGTTTGGTTGCCGATAGTGTGAGATGAAG
GGAATCAATCAATATATATCTTTTATAAACCTAAACCCACTTCATTTGCGCGATTTAGSCGTTCTGCACGTCGAGG
CGGTCCGTTCCGGCCGAGATGCCGCTGATTCGCGTCAATCAGGCGGATACGCTGATTGTGATGGGAAGCGGTCAGC
CTGACGGGGCATTCGGCAATATCTTCGCGCCCGAAGGGGAATACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTCGCC
GGCGGATCGTATGCCCTCCGTGTTCAAGGCGAACCTTCAAAAGGCGAAATGCTCGCGGGCACGGCAGTGATACAAACGGC
GAAGTGCCTGCATTTTCATACGAAAAACGGCCGTCCCGTCCCGTCCAGAGGCGAGGTTTGCCGCAAAAGTCGATTTCCGC
AGCAATCTGTGGACGGCATTCGACAGCGGCGATGTTTGCATATGGGTACGCAAAATTCAAAGCCGCCATCGAT
GGAAACGGCTTTAAGGGGACTTGGACGGAATGCGCGCGGGATGTTTCGGAAAGTTTACGGCCCGCGCGCGAG

GAAGTGGCGGGGAAAATACAGCTATCGCCCAACAGATGCGGAAAAGGGCGGATTCGGCGTGTGTTGCGCGGCAAAAAGAG
 CAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGATGCCAAAGCAAGAGCATCCAAACCTTTCCGCAACCCGACACATCCGTCATCAAC
 GGGCCGGACCGGCGGTCGGCATCCCGACCCCGCGGAACGACGGTCGGCGGGCGGGGCGGCTCTATACCGTTGTA
 CCGCACCTGTCCCTGCCCCACTGGGCGGCGCAGGATTTGCGCAAAAGCCTGCAATCCTTCCGCTCGGCTGCGCCAAT
 TTGAAAAACCGCCAAGGCTGGCAGGATGTGTGCGCCCAAGCCTTTCAAACCCCGTCCATTOCTTTTCAGGCAAAACAG
 TTTTGAACGCTATTTTACGCGCGTGGCAGGTPGCAGGCAACGGAAGCCTTGCCGGTACGGTTACCGGCTATTACGAG
 CCGGTGCTGAAGGGCGACGACAGGCGGACGGCACAAGCCCGCTTCCCGATTACGGTATTCCCGACGATTTTATCTCC
 GTCCCCCTGCGCTGCGCGGTTTGGCGAGCGGAAAAGCCCTTGTCGCGCATCAGGCAGACGGGAAAAAACAGCGGCACAATC
 GACAAATACCGGCGGCGACACATACCGCGGACCTCTCCCGATTCCCGATCACCGCGCGCACAAACGGCAATCAAAGGCAGG
 TTTGAAGGAAGCEGCTTCTCTCCCTACACACGCGCAACCAAAATCAAACGGCGCGCGCTTGACGGCAAAAGCCCGGATA
 CTCGGTTACGCCGAAGACCCCGTTCGAACCTTTTTTTTATGCACATCCAAGGCTCGGGCCGCTGAAAACCCCGTCCGGC
 AAATACATCCGCGCATCGGCTATGCCGACAAAACGAACATCCCTACGTTTCCATCGGACGCTATATGGCGGACAAAAGGC
 TACCTCAAGCTCGGGCAGACCTCGATGCAGGCGCATCAAAGCCTATATGCGGCAAAATCCGCAACCGCCTCGCCGAAGTT
 TTGGGTCAAAAACCCAGCTATATCTTTTCCGCGAGCTTGCCGGAAGCAGCAATGACGGTCCCGTCCGGCGCACTGGCG
 ACGCGTGTGATGGGGGAATATGCCGGCGCAGTCGACCGGCACTACATTACCTTGCGCGCGCGCTTATTTGTGCGCCACC
 GCCCATCCGGTTACCCGCAAGCCCTCAACCGCCTGATTATGGCGCAGGATACCGGCGAGCGGATTAAAGGCGCGGTG
 CGCGTGGATTATTTTGGGGATACGGCGACGAAGCCCGCGAACTTGCCGGCAACAGAAAACACGGGTTACGTCCTGG
 CAGCTCTACCCAACGGTATGAAGCCCGAATACCGCCCGTAAAAGCTT

1	MASPDVKSAD	TLKRPAAPVV	SEKETEAKED	APQAGSQGGG	APSAQGGQDM
51	AAVSEENTGN	GGAAATDKPK	NEDEGAQNDM	PQNAADTDSL	TPNHTPASNM
101	PAGNMENQAP	DAGESEQPAN	QPDMAINTADG	MQGDDPSAGG	ENAGNTAAQG
151	TNQAEMNQTA	GSQNPASSTN	PSATNSGGDF	GRTNVGNSV	IDGPSQNTIL
201	THCKGDSG	NNFLDEEVQL	KSEFEKLSDA	DKISNYKKDG	KNDGKNDKPV
251	GLVADSVQMK	GINQYIIFYK	EKPTSFARFR	RSARSRRSLP	AEMPLIPVNO
301	ADTLIVDGEA	VSLTGHSGNI	FAPEGNYRYL	TYGAEKLPFG	SYALRVQGEF
351	SKGEMLAGTA	VYNGEVLHFF	TENGRPSPSR	GRFAAKVDFG	SKSVDGIIDS
401	GDGLHMGTOK	FKAADGNGF	KGTWTENGCG	DVSGKFYGPA	GEEVAGKYSY
451	RPTDAEKGGF	GVFAGKKEQD	GSGGGCGQSK	SIQTFPPQPD	SVINGPDRPV
501	GIPDPAGTTV	GGGAVYTVV	PHLSLPHWAA	QDFAKSLQSF	RLGCANLKNR
551	QGWQDVCAQA	FQTPVHSFQA	KQFFERYPTP	WQVAGNGSLA	GTVTGYEYBPV
601	LKGGDRRTAQ	ARFPIYGIPD	DFISVPLFAG	LRSGKALVRI	RQTGKNSGTI
651	DNTGGTHTAD	LSRFFITART	TAIKGRFEGS	RFLPYHTRNQ	INGGALDGKA
701	PILGYAEDPV	ELFFMHIGGS	GRKTPSGKY	IRIGYADKNE	HPYVSIGRYM
751	ADKGYLKLQ	TSMQGIKAYM	RQNPQRLAEV	LGQNPFSYIFF	RELAGSSNDG
801	PVGALGTFLM	GEYAGAVDRH	YITLGAFLPV	ATAHFVTRKA	LNRLIMAQDT
851	GSAIKGAVRV	DYFWGYGDEA	GELAGKQKT	GYVWQLLPNG	MKFEYRP*

AG287NE-953

ATGGCTAGCCCCGATGTCAAAGTCGGCGGACACGCTGTCAAACCTGCGGCCCTGTGTTTCTGAAAAAGAGACAGAG
 GCAAAGGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGCGCCATCCGCACAAGGCGGTCAAGATATGGCGGCG
 GTTTCGGAAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAGCAACGACAAACCCAAAAATGAAGACGAGGGGCGCAAAAT
 GATATGCCGCAAAATGCCGCGGATACAGATAGTTTGACACCGAATCACACCCCGCTTCGAATATGCCGCGCGAAAT
 ATGGAACCAAGCACCGGATGCCGGGAATCGGAGCAGCGCGCAACCAACCGGATATGGCAATACGGCGGACGGA
 ATGCAGGCTGACGATCCGTGCGCAGGCGGGGAAATGCCGGCAATACGGCTGCCCAAGGTACAAATCAAGCCGAAAC
 AATCAAAACCGCGGTTCTCAAAATCCTGCCCTCTTCAACCAATCCTAGCGCCACGAATAGCGGTGGTGATTTTGAAGG
 ACGAACGTGGGCAATTCTGTTGTGATTGACGGGCGCTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCTTGT
 AGTGGCAATAATTCTTGGATGAAGAAGTACAGCTAAATCAGAATTGAAAAATTAAAGTGATGCAGACAAAATAAGT
 AATTACAAGAAAGATGGGAAGAATGACGGGAAGAATGATAAATTTGTCGGTTTGGTTGCCGATAGTGTGCAGATGAAG
 GGAATCAATCAATATATTATCTTTTATAAACCTAAACCCACTTCATTGCGCGATTAGGCGTTCTGCACGGTCGAGG
 CGGTGCGCTTCCGCGCGAGATGCCGCTGATCCCGTCAATCAGGCGGATACGCTGATGTGCGATGGGGAAGCGGTCAGC
 CTGACGGGGCATTCGCGCAATATCTTCCGCGCCGAAGGAATTACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTGCCC
 GCGGATCGTATGCCCTCCGTGTTCAAGGCGAACCTTCAAAAGGCGAAATGCTCGCGGGCACGGCAGTGACACGGC
 GAAGTGCTGCATTTTCATACGAAAAACGGCGCTCCGTCCCGTCCAGAGGCAGGTTGCCGCAAAAGTCGATTTCCGC
 AGCAATCTGTGGACGGCATTTATCGACAGCGCGATGGTTTGCATATGGGTACGCAAAAATTCAAAGCCGCCATCGAT
 GGAACCGGCTTTAAGGGGACTTGGACGGAATGGCGCGGGGATGTTCCGGAAAGTTTACGCGCCGCGCGCGAG
 GAAGTGGCGGGAATAACAGCTATCGCCCAACAGATGCGGAAAAGGGCGGATTCGGCGTGTTCGCGGCAAAAAGAG
 CAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGCCACCTACAAAGTGGACGAATATCACGCCAACGCCCCGTTTCCCATCGACCAT
 TTCAACACCAAGCAACCAAGTCGCGCGGTTTTCAGGCTCTGACCGGTTCCGTGAGTTGACCAAGCAAAAACGGCAGG
 AAATCGACATCACCATCCCCGTTGCCAACCTGCAAGCGGTTTCGCAACACTTTACCGACCACTGAAATCAGCCGAC
 ATCTTCGATGCCGCCCAATATCCGGACATCCGCTTTGTTTCCACCAATTCAACTTCAACGGCAAAAACGTTTCC
 GTTACGGCAACCTGACCATGACGCGCAAAACCGCCCCGTCAAACTCAAGCCGAAAAATTCAACTGCTACCAAGC
 CCGATGGCGAAAACCGAAGTTTGGCGCGCGACTTCAGCACCACCATCGACCGCAACCAATGGGGCGTGGACTACCTC
 GTTAACGTTGGTATGACCAAAAGCGTCCGCATCGACATCAAAATCGAGGCAGCCAAACAATAAAAGCTT

1 MASPDVKSAD TLSKPAAPVV SEKETEAKED APQAGSQGG APSAQGGQDM

51	AAVSEENTGN	GGAAATDKPK	NEDEGAQNDM	PQNAADTDSL	TPNHFPASNM
101	PAGNMENQAP	DAGESEQPAN	QPDMAATADG	MQGDDPSAGG	ENAGNTAAQG
151	TNQAENNQTA	GSQNPASSTN	PSATNSGGDF	GRTNVGNVSV	IDGPSQNTIL
201	THCKGSDCSG	NNFLDREVQL	KSEFEKLSDA	DKISNYKKDG	KNDGKNDKPV
251	GLVADSVQMK	GINQYIIFPK	PKPTSFARFR	RSARSRRSLP	AEMPLIFVNO
301	ADTLIVDGEA	VSLTGHSGNI	FAPEGNYRYL	TYGAEKLPGG	SYALRVQGEF
351	SKGEMLAGTA	VYNGEVLHFF	TENGRPSPSR	GRFAAKVDFG	SKSVDGIIDS
401	GDGLHMGTOK	FKAAIDNGF	KGTWTENGGG	DVSGKFYGPA	GEEVAGKYSY
451	RPTDAEKGGF	GVFAGKKEQD	GSGGGGATYK	VDEYHANARF	AIDHFNSTSN
501	VGGFYGLTGS	VEFDQAKRDG	KIDITIPVAN	LQSGSQHFTD	HLKSADIFDA
551	AQYPDIRFVS	TKFNFNGKLL	VSVDGNLTMH	GRTAPVKLKA	EKFNCYQSPM
601	AKTEVCGGDF	STTIDRTKNG	VDYLVNVGMT	KSVRIDIQIE	AAQ*

AG287N2-961

ATGGCTAGCCCCGATGTCAAGTCGGCGGACACGCTGTCAAAACCTGCCGCCCTGTTGTTTCTGAAAAAGAGACAGAG
GCAAAGGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGGCCATCCGCACAAGGCGGTCAAGATATGGCGGCG
GTTTCGGAAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAGCAACGGACAAACCCAAAATGAAGACGAGGGGGCGCAAAAT
GATATGCCCGCAAAATGCCCGGATACAGATAGTTTGACACCGAATCACACCCCGCTTCGAATATGCCCGCGCGAAAT
ATGGAACCAAGCACCGGATGCCGGGGAATCGGAGCAGCCGGCAAAACCAACCGGATATGGCAAATACGGCGGACGGA
ATGCAGGGTGACGATCCGTCGGCAGGCGGGGAAAATGCCGGCAATACGGCTGCCCAAGGTACAAATCAAGCGGAAAAC
AATCAAACCGCGGTTCTCAAAATCCTGCCCTCTTCAACCAATCTTAGCGCCACGAATAGCGGTGGTGATTTTGGAAAGG
ACGAACGTCGGCAATTTCTGTTGTGATTGACGGGCGCTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCTTGT
AGTGGCAATTAATTTCTGGATGAAGAAGTACAGCTAAAATCAGAATTTGAAAAATTAAGTGATGCAGACAAAATAAGT
AATTACAAGAAAGATGGGAAGAATGACGGGAAGAATGATAAATTTGTCGGTTTGGTTGCCGATAGTGTGCAGATGAAG
GGAATCAATCAATATATTTATCTTTTATAAACCTAAACCCACTTCATTTCGCGGATTTAGGCGTTCTGCACGGTCGAGG
CGGTGCGCTTCGGCGGAGATGCCGCTGATTCCCGTCAATCAGCGGATACGCTGATTGTGATGGGGAAGCGGTGAGC
CTGACGGGGCAATTCGGCAATATCTTCGGCGCCGAAGGGAATACCCTGATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTCGCC
GGCGGATCGTATGCCCTCCGTGTTCAAGGCGAACCCTTCAAAGGCGAATGCTCGCGGCGACCGGAGTGTACAACGGC
GAAGTGCTGCAATTTTCATACGGAAAACCGCGCTCCGCTCCCGTCCAGAGGCGAGGTTGCCCGCAAAAGTCGATTTCGGC
AGCAATCTGTGGACGGCATTATCGACAGCGCGGATGGTTTGCATATGGGTACGCCAAAATTCAAAGCGGCCATCGAT
GGAAACGGCTTTAAGGGGACTTGGACGGAAAATGGCGCGCGGGATGTTTCCGGAAAGTTTACGGCGCGCGCGCGAG
GAAGTGGCGGGAATACAGCTATCGCCCAACAGATGCGGAAAAGGGCGGATTTCGGCGTGTTCGCCGCAAAAAGAG
CAGGATGCTGATCCGGAGGAGGAGGAGGCCAAACGACGACCGCTTAAAAAAGCTGCCACTGTGGCCATTGCTGCTGCC
TACAACAATGGCCAAAGAAATCAACGGTTTCAAAGCTGGAGAGACCATCTACGACATTTGATGAAGACGGCACAATTACC
AAAAAGAGCGCAACTGCGCCGATGTTGAAGCCGACGACTTTAAAGGTCTGGGTCTGAAAAAGTCTGTGACTAACCTG
ACCAAAACCGTCAATGAAACAAACAAACCGTCGATGCCAAAGTAAAGCTGCAGAATCTGAAATAGAAAAGTTAAACA
ATCAAGTTAGCAGACTGATGCCGCTTTAGCAGATCTGATGCCGCTCTGGATGCAACCACCAACGCTTGAATGAA
TTGGGAGAAAATATAACGACATTTGCTGAAGAGACTAAGACAAATATCTGTAATAATTTGATGAAAATTAGAAGCCGTG
GCTGATACCGTCGACAAGCATGCCGAAGCATTCACGATATCGCCGATTTCATTGGATGAAACCAACACTAAGGCAGAC
GAAGCGCTCAAACCGCCAAATGAAGCCAAACAGACGCGCGAAGAAACCAACAAACCGTCGATGCCAAAGTAAAGCT
GCAGAACTGCAGCAGGCAAGCCGAGCTGCCGCTGGCACAGCTAATACTGCAGCCGACAAGGCCGAGCTGTGCT
GCAAAAGTTACCGACATCAAAGCTGATATCGCTACGACAAAGATAATATTTGCTAAAAAGCAACAGTGCAGCGTG
TACACCAAGAGAAGAGTCTGACAGCAAAATTTGTCAGAAATTTGATGCTCTGAACGCTACTACCGAAAATTTGGACACACGC
TTGGCTTCTGTGAAAAATCCATTGCCGATACGATCTCGCTGAACGTTTGGATAAAACAGTGTGACACCTGCGC
AAAGAAACCGCCAAAGGCTTGCAGAACAAAGCCGCTCTCGGCTCTGTTCCAAACCTTACAACGTTGGGTCGGTTCAAT
GTAACGGCTGCACTCGCGGCTACAAATCCGAATCGGCAGTCCCATCGGTACCGGCTTCGGCTTTACCGAAAACCTT
GCCGCCAAAGCAGGCGTGCGAGTCCGCACTTCGTCGGTTCTTCGCGAGCTACCATGTGCGGCTCAATTACGAGTGG
TAAAGCTT

1	MASPDVKSAD	TLSPAPV	SEKETEAKED	APQAGSQGQ	APSAQGGQDM
51	AAVSEENTGN	GGAAATDKPK	NEDEGAQNDM	PQNAADTDSL	TPNHTPASNM
101	PAGNMENQAP	DAGESEQPAN	QPDMAATADG	MQGDDPSAGG	ENAGNTAAQG
151	TNQENNQTA	GSQNPASSTN	PSATNSGGDF	GRTNVGNVSV	IDGFSQNTIL
201	THCKGSDSCG	NNFLDEEVQL	KSEFEKLSDA	DKISNYKKDG	KNDGKNDKFV
251	GLVADSVQMK	GINQYIIFYK	PKPTSFARFR	RSARSRRSLP	AEMPLIPVNO
301	ADTLIVDGEA	VSLTGHSGNI	FAPEGNYRYL	TYGAEKLPQG	SYALRVQGEF
351	SKGEMLAGTA	VYNGEVLHFH	TENGRPSPSR	GRFAAKVDFG	SKEVDGIIDS
401	GDGLHMGTOK	FKAIDGNGF	KGTWTENGGO	DVSGKPYGPA	GEEVAGKYSY
451	RPTDAEKGGF	GVFAGKKEQD	SGSGGGATND	DDVKAATVA	IAAAYNNGQE
501	INGFKAGETI	YDIDEDGTIT	KKDATAADVE	ADDFKGLGLK	KVVTNLTKTV
551	NENKQNVDAK	VKAAESIEK	LPTKLADTDA	ALADTDAALD	ATTNALNKLK
601	ENITTFABET	RTNIVKIDEK	LEAVADTVDK	HASAFNDIAD	SLDETNTKAD
651	EAVKTANEAK	QTAETTKQNV	DAKVKAETA	AGKAEAAAGT	ANTAADKAEA
701	VAKVETDIKA	DIATNRDNIA	KKANSADVIT	REESDSKFVR	IDGLNATTEK
751	LDTRLASAEK	SIADHDTRLN	GLDKTVSDLR	KETRQGLAEQ	AALSGLFQPY
801	NVGRFNVTA	VGGYKSESAV	AIGTGFRPTE	NFAAKAGVAV	GTSSGSSAAY
851	HVGVMYEW*				

Exemplo 2 - Híbridos de 287

A expressão de 287 como de comprimento total com um C-terminal marcado com His, ou sem o seu péptido líder, mas com um C-terminal marcado com His, origina níveis de expressão razoavelmente baixos. É conseguida uma melhor expressão utilizando uma fusão GST do terminal N.

Para gerar o híbrido 953-287, os péptidos líderes das duas proteínas foram omitidas pela designação do primer da frente a jusante do líder de cada sequência; a sequência do codão de paragem foi omitido no primer inverso 953 mas incluído no primer reverso 287. Para o gene 953, os primers 5' e 3', usados para amplificação, incluíam um local de restrição *NdeI* e um *BamHI*, respectivamente, enquanto que para a amplificação do gene 287, os primers 5' e 3' incluíam um local de restrição *BamHI* e um *XhoI*, respectivamente. Desta forma, pode ser conseguida uma clonagem direccional sequencial dos dois genes em pET21b+, utilizando *NdeI-BamHI* (para clonar o primeiro gene), e, subsequentemente, *BamHI-XhoI* (para clonar o segundo gene).

O híbrido 919-287 poder ser obtido pela clonagem da sequência codificando a porção madura do 287 no local *XhoI*, na extremidade 3' do clone 919-His em pET21b+. Os primers usados para amplificação do gene 287 foram destinados para introduzir um local de restrição *SalI* na extremidade 5'- e um local *XhoI* na extremidade 3'- do fragmento PCR. Visto que as extremidades coesivas produzidas pelas enzimas de restrição *Sall* e *XhoI* eram compatíveis, o produto 287 do PCR, digerido com *Sall-XhoI*, podia ser inserido no clone pET21b-919, clivado com *XhoI*.

A ORF46.1-287 híbrida foi obtida de forma similar.

A eficácia bactericida (estirpe homóloga) dos anticorpos criados contra as proteínas híbridas foi comparada com os anticorpos criados contra as misturas simples dos antígenos componentes:

	Mistura com 287	Híbrido com 287
919	32000	16000
953	8192	8192
ORF46.1	128	8192

Foram também obtidos dados da actividade bactericida contra a estirpes MenB e contra os serotipos A e C para os 919-287 e 953-287:

	919		953		ORF46.1	
<i>Estirpe</i>	<i>Mistura</i>	<i>Híbrida</i>	<i>Mistura</i>	<i>Híbrida</i>	<i>Mistura</i>	<i>Híbrida</i>
MC58	512	1024	512	1024	-	1024
NGH38	1024	2048	2048	4096	-	4096
BZ232	512	128	1024	16	-	-
MenA (F6124)	512	2048	2048	32	-	1024
MenC (C11)	>2048	n.d.	>2048	n.d.	-	n.d.
MenC (BZ133)	>4096	>8192	>4096	<16	-	2048

Foram também construídos híbridos da ORF46.1 e 919. Foram conseguidos os melhores resultados (título superior a quatro vezes) com o 919 no terminal N.

Foram também testados os híbridos 919-519His, ORF97-225His e 225-ORF97His. Estes originaram filtros ELISA e respostas bactericidas de anticorpos.

Como os híbridos de duas proteínas A e B podem ser quer $\text{NH}_2\text{-A-B-COOH}$ ou $\text{NH}_2\text{-B-A-COOH}$, foram também produzidos híbridos reversos com 287 no terminal N, mas utilizando ΔG287 . Foi utilizado um painel de estirpes incluindo a estirpe homóloga 2996. O FCA foi utilizado como adjuvante:

	287 & 919		287 & 953		287 & ORF46.1	
<i>Estirpe</i>	$\Delta\text{G287-919}$	<i>919-287</i>	$\Delta\text{G287-953}$	<i>953-287</i>	$\Delta\text{G287-46.1}$	<i>46.1-287</i>
2996	128000	16000	65536	8192	16384	8192
BZ232	256	128	128	<4	<4	<4
1000	2048	<4	<4	<4	<4	<4
MC58	8192	1024	16384	1024	512	128
NGH38	32000	2048	>2048	4096	16384	4096
394/98	4096	32	256	128	128	16
MenA (F6124)	32000	2048	>2048	32	8192	1024

(continuação)

	287 & 919		287 & 953		287 & ORF46.1	
Estirpe	$\Delta G287-919$	919-287	$\Delta G287-953$	953-287	$\Delta G287-46.1$	46.1-287
MenC (BZ133)	64000	>8192	>8192	<16	8192	2048

São geralmente vistos títulos bactericidas com 287 no terminal N.

Quando fundidas à proteína 961 [sequência $NH_2-\Delta G287-961-COOH$ acima descrita], a proteína resultante é insolúvel e deve ser desnaturada e renaturada para purificação. A seguir à renaturação, descobriu-se que cerca de 50% da proteína permanecia insolúvel. Foram comparadas as proteínas solúveis e insolúveis e foram obtidos títulos bactericidas muito melhores com a proteína solúvel (FCA como adjuvante):

	2996	BZ232	MC58	NGH38	F6124	BZ133
Solúvel	65536	128	4096	>2048	>2048	4096
Insolúvel	8192	<4	<4	16	n.d.	n.d.

Os títulos com forma insolúvel foram, contudo, aperfeiçoados pela utilização, desta vez, de adjuvante de alumínio:

Insolúvel	32768	128	4096	>2048	>2048	2048
------------------	-------	-----	------	-------	-------	------

A 961c foi também usada nas proteínas híbridas (ver acima). Como a 961 e as suas variantes de domínio direccionam a expressão eficiente, elas são idealmente adequadas como porção N-terminal duma proteína híbrida.

Deverá compreender-se que a invenção foi descrita apenas como exemplo e que se podem fazer modificações enquanto permanecendo no âmbito da invenção. Por exemplo, é previsto o uso de proteínas proveniente de outras estirpes [e.g. ver WO00/66741 para as sequências polimórficas para o 187, e 953].

DETALHES EXPERIMENTAIS

Estratégia de Clonagem e Design Oligonucleotídico

Os genes codificando para os antígenos de interesse foram amplificados por PCR, utilizando oligonucleótidos concebidos com base na sequência genómica de *N. meningitidis* B MC58. O DNA genómico da estirpe 2996 foi sempre usado como um padrão nas reacções de PCR, a menos que especificado de outra forma, e os fragmentos amplificados foram clonados no vector de expressão pET21b+ (Novagen) para expressar a proteína como o produto marcado com His C-terminal, ou em pET-24b+ (Novagen) para expressar a proteína na forma "não marcada" (e.g. ΔG 287K).

Quando uma proteína foi expressa sem um parceiro de fusão e com o seu próprio péptido líder (se presente), foi realizada a amplificação do molde de leitura aberta (codões ATG ou de STOP).

Quando uma proteína foi expressa na forma "não marcada", o péptido líder foi omitido designando o primer de amplificação da extremidade 5', a jusante da sequência líder prevista.

A temperatura de fusão dos primers usados na PCR dependeu do número e tipo de nucleótidos hibridizantes no primer total, e foi determinado usando as fórmulas:

$$T_{m1} = 4 (G+C) + 2 (A+T) \quad (\text{cauda excluída})$$

$$T_{m2} = 64,9 + 0,41 (\%GC) - 600/N \quad (\text{primer total})$$

As temperaturas de fusão dos oligonucleótidos seleccionados foram, usualmente, entre 65°-70°C para todo o oligo, e de 50-60°C para a região de hibridização apenas.

Os oligonucleótidos foram sintetizados utilizando um Sintetizador Perkin Elmer 394 DNA/RNA, eluídos a partir das

colunas em 2.0ml de NH₄OH, e desprotegidos por 5 horas de incubação a 56°C. Os oligos foram precipitados pela adição de 0,3M de acetato de Na, e dois volumes de etanol. As amostras foram centrifugadas e os peletes ressuspensos em água.

		Sequências	Local de Restrição
fu-(ΔG287)-919-His	Fwd	CGCGGATCCGGTGGTGGTGGT- CAAAGCAAGAGCATCCAAACC	BamHI
	Rev	CCCAAGCTT-TTCGGGCGGTATTCGGGCTTC	HindIII
fu-(ΔG287)-953-His	Fwd	CGCGGATCCGGTGGTGGTGGT- GCCACCTACAAAGTGGAC	BamHI
	Rev	GCCCAAGCTT-TTGTTTGGCTGCCTCGAT	HindIII
fu-(ΔG287)-961-His	Fwd	CGCGGATCCGGTGGTGGTGGT- ACAAGCGACGACG	BamHI
	Rev	GCCCAAGCTT-CCACTCGTAATTGACGCC	HindIII
fu-(ΔG287)-Orf46.1-His	Fwd	COCGGATCCGGTGGTGGTGGT- TCAGATTGGCAAACGATTC	BamHI
	Rev	CCCAAGCTT-CGTATCATATTTACGTGC	HindIII
fu-(ΔG287-919)-Orf46.1-His	Fwd	CCCAAGCTTGGTGGTGGTGGTGGT- TCAGATTGGCAAACGATTC	HindIII
	Rev	CCCGCTCGAG-CGTATCATATTTACGTGC	XhoI
fu-(ΔG287-Orf46.1)-919-His	Fwd	CCCAAGCTTGGTGGTGGTGGTGGT- CAAAGCAAGAGCATCCAAACC	HindIII
	Rev	CCCGCTCGAG-CGGGCGGTATTCGGGCTT	XhoI
fu ΔG287(394,98)-	Fwd	CGCGGATCCGCTAGC-CCCGATGTTAAATCGGC	NheI
	Rev	CGGGGATCC-ATCCTGCTCTTTTTGCCGG	BamHI
NB - Todas as reacções PCR utilizam a estirpe 2896 a menos que especificado de outra forma (ex. estirpe MC58)			

Em todas as construções iniciando com um ATG não seguido por um único local *NheI* como um local de clonagem na extremidade 5' (e.g. todos os que continham 287 no terminal N) têm dois codões adicionais (GCT AGC) fundidos à sequência de codificação do antigénio.

Preparação dos templates de DNA cromossómicos

As estirpes 2996, MC58, 394,98, 1000 e BZ232 (e outras) de *N.meningitidis* desenvolveram para a fase exponencial em 100ml de meio GC, recolhidas por centrifugação e ressuspensas em 5ml

de tampão (20% de p/v de sucrose, 50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, pH8). Após 10 minutos de incubação em gelo, a bactéria foi lisada adicionando 10ml de solução de lise (50mM de NaCl, 1% de Na-Sarkosil, 50µg/ml de Proteinase K), e a suspensão incubada a 37°C durante 2 horas. Foram realizadas duas extracções de fenol (equilibradas para um pH de 8), e uma extracção de CHCl₃/álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado pela adição de acetato de sódio a 0,3M e 2 volumes de etanol, e recolhido por centrifugação. O pelet foi lavado uma vez com 70% de etanol (v/v) e redissolvido em 4.0ml de tampão TE (10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0). Foi medida a concentração de DNA pela leitura da OD₂₆₀.

Amplificação por PCR

O protocolo de PCR padrão foi como se segue: foram utilizados 200ng de DNA genómico provenientes da estirpes 2996, MC581000, ou BZ323, ou 10ng de preparação de DNA plasmídico de clones recombinantes, como padrão, na presença de 40µM de cada primer oligonucleotídico, solução de 400-800µM de solução de dNTPs, 1xtampão PCR (incluindo 1,5mM de MgCl₂), 2,5 unidades de polimerase Taq/DNA (usando o *Perkin-Elmer AmpliTaq*, *Boeringher Mannheim ExpandTM Long Template*).

Após uma incubação de 3 minutos de toda a mistura a 95°C, cada amostra sofreu uma amplificação de dois passos: os primeiros 5 ciclos foram realizados utilizando uma temperatura de hibridização que excluiu a cauda do enzima de restrição do primer (T_{m1}). Isto foi seguido por 30 ciclos de acordo com a temperatura de hibridização calculada para todo o comprimento dos oligos (T_{m2}). Os tempos de alongamento, realizados a 68°C e 72°C, variaram de acordo com o comprimento do ORF a ser amplificado. No caso do ORF1, o tempo de alongamento, a partir de 3 minutos, aumentou 15 segundos em cada ciclo. Os

ciclos foram completados com um passo de extensão de 10 minutos a 72°C.

O DNA amplificado foi carregado directamente num gel de agarose a 1%. O fragmento de DNA, correspondente à banda de tamanho correcto, foi purificado a partir do gel utilizando o Kit de Extração em Gel da Qiagen, seguindo o protocolo do fabricante.

Digestão dos fragmentos de PCR e dos vectores de clonagem

O DNA purificado, correspondente ao fragmento amplificado, foi digerido com enzimas de restrição apropriados em Pet-21b+, Pet22b+ ou pet-24b+. Os fragmentos digeridos foram purificados utilizando o kit de purificação por PCR (seguindo as instruções do fabricante) e eluído com H₂O ou Tris 10mM, pH 8,5. Os vectores plasmídicos foram digeridos com os enzimas de restrição apropriados, carregados num gel de agarose a 1,0%, e a banda correspondendo ao vector digerido purificada utilizando o Kit de Extração em Gel da Qiagen QIAquick.

Clonagem

Os fragmentos correspondentes a cada gene, previamente digeridos e purificados, foram ligados em pET21b+, Pet22b+ ou Pet-24b+. Foi usada uma proporção molar de 3:1 fragmento/vector, com DNA ligase T4, no tampão de ligação fornecido pelo fabricante.

O plasmídeo recombinante foi transformado em *E.coli*DH5 competente ou HB101 por incubação na solução de reacção da ligase e bactéria durante 40 minutos em gelo, depois a 37°C, durante 3 minutos. Isto foi seguido por adição de 800µl de soro LB e incubação a 37°C durante 20 minutos. As células foram centrifugadas a uma velocidade máxima numa microcentrífuga Eppendorf, ressuspenas em, aproximadamente

200µl do sobrenadante e carregadas numa placa de agar de ampicilina de LB (100mg/ml).

O despiste dos clones recombinantes foi realizado pelo desenvolvimento de colónias seleccionadas ao acaso a 37°C em 4,0ml de soro LB + 100µg/ml de ampicilina. As células foram revestidas e o DNA do plasmídeo extraído utilizando um Kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep, seguindo as instruções do fabricante. Aproximadamente 1µg de cada minipreparação individual foi digerido com os enzimas de restrição apropriados e o produto de digestão carregado num gel de agarose a 1-1,5% (dependendo do tamanho do inserto esperado), em paralelo com o marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder, GIBCO). Os clones positivos foram seleccionados com base no tamanho do segmento inserido.

Expressão

Após a clonagem de cada gene no vector de expressão, os plasmídeos recombinantes foram transformados em estirpes *E.coli*, adequadas para a expressão da proteína recombinante. 1µl de cada construção foi usado para transformar a *E.coli* BL21-DE3 como acima descrita. Foram inoculadas colónias recombinantes únicas em 2ml de LB+Amp(100µg/ml), incubadas a 37°C durante a noite, diluídas então 1:30 em 20ml de LB+Amp (100µg/ml), em frascos de 100ml, até se obter uma OD₆₀₀ entre 0,1 e 0,2. Os frascos foram incubados a 30°C ou a 37°C num agitador de banho de água giratório até que a OD₆₀₀ indicou um crescimento exponencial adequado para a indução da expressão (0,4-08,8 OD). A expressão da proteína foi induzida pela adição de 1,0mM de IPTG. Após 3 horas de incubação a 30°C ou 37°C a OD₆₀₀ foi medida e a expressão examinada. 1,0ml de cada amostra foram centrifugados numa microcentrifugadora, o pelet resuspenso em PBS e analisado por SDS-PAGE e coloração com azul de Comassie.

Purificação de Proteínas Marcadas com His

Várias formas de 287 foram clonadas a partir de estirpes 2996 e MC58. Estas foram construídas com uma fusão de terminal C marcada com His e incluíam uma forma madura (aa 18-427), construções com deleções ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ e $\Delta 4$) e clones compostos de domínios B ou C. Para cada clone purificado como uma fusão His, foi registada uma única colónia e desenvolvida durante a noite a 37°C numa placa de agar LB/Amp (100µg/ml). Foi inoculada uma colónia isolada em 20ml de meio líquido LB/Amp (100µg/ml) e crescido durante a noite a 37°C com agitação. A cultura da noite foi diluída 1:30 em 1,0 L de meio líquido LB/Amp (100µg/ml) e deixado crescer à temperatura óptima (30 ou 37°C) até que a OD₅₅₀ atingiu 0,6-0,8. A expressão da proteína recombinante foi induzida por adição de IPTG (concentração final de 1,0mM) e a cultura incubada por um período adicional de 3 horas. As bactérias foram recolhidas por centrifugação a 8000g durante 15 minutos a 4°C. O *pellet* bacteriano foi resuspenso em 7,5 ml de (i) tampão A frio (300 mM de NaCl, 50 mM de tampão fosfato, 10 mM de imidazole, pH 8,0), para as proteínas solúveis, ou (ii) tampão B (10mM de Tris-HCl, 100 mM de tampão fosfato, pH 8,8, opcionalmente, 8M de ureia), para as proteínas insolúveis. As proteínas purificadas numa forma insolúvel incluíam 287-His, $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ e $\Delta 4$ 287-His, $\Delta 4$ 287MC58-His, 287c-His e 287cMC58-His. A proteína 287bMC58-His era insolúvel e foi purificada de acordo com o estipulado. As células foram destruídas por sonicação em gelo, 4 vezes durante 30 segundos a 40W utilizando um sonificador Branson 450 e centrifugadas a 13000xg durante 30 minutos a 4°C. Para as proteínas insolúveis, os pellets foram ressuspensos em 2,0 ml de tampão C (6 M de hidrocloreto de guanidina, 100mM de tampão fosfato, 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, e tratados com três passagens dum homogenizador Dounce. O

homogenizado foi centrifugado a 13000 g durante 30 minutos e o sobrenadante retido. Os sobrenadantes para ambas as preparações solúveis e insolúveis foram misturados com 150µl de resina Ni²⁺ (previamente equilibrada quer com tampão A como com tampão B, como apropriado), e incubados à temperatura ambiente com agitação suave durante 30 minutos. A resina era *Chelating Sepharose Fast Flow* (Sefarose Quelante de Fluxo Rápido) (Pharmacia), preparada de acordo com o protocolo do fabricante. A preparação em lotes foi centrifugada a 700g, durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. A resina foi lavada duas vezes (em lotes) com 10ml de tampão A ou B durante 10 minutos, ressuspensa em 1,0ml de tampão A ou B e carregada numa coluna descartável. A resina continuou a ser lavada quer com (i) tampão A a 4°C ou (ii) tampão B à temperatura ambiente, até que a OD₂₈₀ do fluxo corrente atingiu 0,02-0,01. A resina foi ainda lavada com quer (i) tampão C frio (300mM NaCl, 40mM de tampão fosfato, 20mM de imidazol, pH 8,0), ou (ii) tampão D (10mM de Tris-HCl, 100mM de tampão fosfato, pH 6,3 e, opcionalmente, 8M de ureia) até que a OD₂₈₀ do fluxo corrente atingiu os 0.02-0,01. Esta proteína de fusão His foi eluída por adição de 700µl de quer (i) tampão de eluição A (300mM de NaCl, 50mM de tampão fosfato, 250 mM de imidazol, pH 8,0), ou (ii) tampão de eluição B (10mM de Tris-HCl, 100 mM de tampão fosfato, pH 4,5 e, opcionalmente, 8M de ureia), e as fracções foram recolhidas até que a OD₂₈₀ indicou que foram obtidas todas as proteínas recombinantes. 20µl de aliquotas de cada fracção de eluição foram analisadas por SDS-PAGE. As concentrações das proteínas foram calculadas utilizando o ensaio Bradford.

Renaturação das proteínas de fusão His desnaturadas

Foi requerida a desnaturação para solubilizar a 287bM C8, de tal forma que foi utilizado um passo de renaturação

antes da imunização. Foi adicionado glicerol às fracções desnaturadas acima obtidas para dar uma concentração final de 10% v/v. As proteínas foram diluídas para 200µg/ml utilizando o tampão de diálise I (10% v/v de glicerol, 0,5M de arginina, 50 mM de tampão fosfato, 5,0 mM de glutatona reduzida, 0,5 mM de glutaniona oxidizada, 2,0M de ureia, pH 8,8), durante 12-14 horas a 4°C. A concentração da proteína foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{Proteína (mg/ml)} = (1,55 \times DO_{280}) - (0,76 \times OD_{260})$$

Imunização

Foram imunizados ratinhos Balb/C contra antigénios nos dias 0, 21 e 35, e os soros analisados no dia 49.

Análise de Soros - ELISA

A estirpe encapsulada MenB M7 encapsulada e as estirpes capsuladas foram plaqueadas em placas de agar de chocolate e incubadas durante a noite a 37°C com 5% de CO₂. Foram recolhidas as colónias bacterianas das placas de agar utilizando uma zargatoa com ponta de dracon esterilizada e inoculado num Soro de Mueller-Hinton (Difco) contendo 0,25% de glucose. O crescimento bacteriano foi monitorizado a cada 30 minutos seguindo a OD₆₂₀. As bactérias foram deixadas crescer até a DO atingir o valor de 0,4-0,5. A cultura foi centrifugada durante 10 minutos a 4000rpm. O sobrenadante foi rejeitado e as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS, resuspensas em PBS contendo 0,025% de formaldeído, e incubadas durante 1 hora a 37°C e então, depois, durante a noite, a 4°C com agitação. 100µl de células bacterianas foram adicionados a cada poço numa placa de Greiner de 96 poços e incubados durante a noite a 4°C. Os poços foram então lavados três vezes com tampão de lavagem PBT (0,1% de Tween 20 em PBS).

200µl de tampão de saturação (2,7% de polivinilpirrolidona 10 em água) foram adicionados a cada poço e as placas incubadas durante 2 horas a 37°C. Os poços foram lavados três vezes com PBT. 200µl de soro diluído (Tampão de Diluição: 1% de BSA, 0,1% de Tween-20, 0,1% de NaN₃ em PBS) foram adicionados a cada poço e as placas incubadas durante 2 horas a 37°C. Os poços foram lavados três vezes com PBT. 100µl de soro anti-rato conjugado de coelho HRP (Dako), diluído com um tampão de diluição 1:2000 foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas durante 90 minutos a 37°C. Os poços foram lavados três vezes com tampão PBT. 100µl de tampão substrato para HRP (25ml de tampão citrato pH5, 10mg de O-fenildiamina e 10µl de H₂O₂) foram adicionados a cada poço e as placas foram deixadas à temperatura ambiente durante 20 minutos. 100µl de H₂SO₄ a 12,5% foram adicionados a cada poço e seguiu-se a OD₄₉₀. Foram calculados os títulos ELISA arbitrariamente como a diluição dos soros, o que originou um valor de OD₄₉₀ de 0,4 superior a 1:400.

Análise de Soros - Ensaio de ligação de Bactérias de Pesquisa de FACS

A estirpe MenB M7 acapsulada foi plaqueada em placas de agar de chocolate e incubada durante a noite a 37°C com 5% de CO₂. As colónias bacterianas foram recolhidas das placas de agar utilizando uma zargatoa com ponta de dracon esterilizada e inoculadas em 4 tubos contendo cada um 8ml de Soro de Mueller-Hinton (Difco) contendo 0,25% de glucose. O crescimento bacteriano foi monitorizado a cada 30 minutos seguindo a OD₆₂₀. As bactérias foram deixadas crescer até a OD atingir o valor de 0,35-0,5. A cultura foi centrifugada durante 10 minutos a 4000 rpm. As células foram ressuspensas num tampão bloqueador para atingir uma OD₆₂₀ de 0,05. Foram adicionados 100µl de células bacterianas a cada poço duma

placa de 96 poços Costar. 100µl dos soros diluídos (1:100, 1:200, 1:400) (em tampão bloqueador) foram adicionados a cada poço e as placas incubadas durante 2 horas a 4°C. As células foram centrifugadas durante 5 minutos a 4000rpm, o sobrenadante aspirado e as células lavadas por adição de 200µl/poço de tampão bloqueador em cada poço. 100µl de R-Ficoeritrina conjugada F(ab)₂ de cabra anti-ratinho, diluído 1:100, foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas durante 1 hora a 4°C. As células foram rodadas descendentemente por centrifugação a 4000rpm durante 5 minutos e lavadas por adição de 200µl/poço de tampão bloqueador. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 200µl/poço de PBS, 0,25% de formaldeído. As amostras foram transferidas para tubos FACScan e lidas. A condição para a estabilização da FACScan (Potência de Laser 15mW) foi: FL2 ON; limite FSC-H:92; voltagem FSC PMT: E 01; SSC PMT:474; Ganhos de Amp. 6,1; PMT FL-2:586; valores de compensação:0.

Análise de Soros - Ensaio Bactericida

A estirpe 2996 de *N.meningitidis* foi deixada crescer durante a noite a 37°C em placas de chocolate de agar (começando com um stock gelado) com CO₂. Foram recolhidas colónias e usadas para inocular 7ml de soro Mueller-Hinton, contendo 0,25% de glucose para atingir uma OD₆₂₀ DE 0,05-0,08. A cultura foi incubada durante, aproximadamente, 1,5 horas a 37°C com agitação até que a OD₆₂₀ atingiu o valor de 0,23-0,24. As bactérias foram diluídas em 50mM de tampão fosfato, pH 7.2, contendo 10mM de MgCl₂, 10mM de CaCl₂ e 0,5% (p/v) de BSA (tampão ensaio), na diluição de trabalho de 10⁵ de CFU/ml. O volume total da mistura de reacção final foi de 50µl com 25µl numa diluição dupla em série do soro de teste, 12,5µl de bactérias na diluição de trabalho, 12,5µl de complemento de coelho bebé (concentração final 25%).

Os controles incluíram bactérias incubadas com soro complemento, soros imunes incubados com bactérias e com complemento inactivado por aquecimento a 56°C durante 30'. Imediatamente após a adição do complemento de coelho bebé, 10µl dos controles foram plaqueados em placas de agar Mueller-Hinton utilizando o método de inclinação ("tilt method") (tempo 0). A placa de 96 poços foi incubada durante 1 hora a 37°C com rotação. 7µl de cada amostra foram plaqueados em placas de agar Mueller-Hinton, como manchas, enquanto 10µl dos controles foram plaqueados em placas de agar Mueller-Hinton utilizando o método de inclinação ("tilt method") (tempo 1). As placas de agar foram incubadas durante 18 horas a 37° e as colónias, correspondendo ao tempo 0 e tempo 1, foram contadas.

Análise de Soros - Western Blots

As proteínas purificadas (500ng/linha), as vesículas de membrana externa (5µg) e extractos celulares totais (25µg) provenientes da estirpe 2996 MenB foram carregadas num gel de poliacrilamida SDS a 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada durante 2 horas a 150mA a 4°C, utilizando um tampão de transferência (base Tris a 0,3%, 1,44% de glicina, 20% (v/v) de metanol). A membrana foi saturada por incubação durante a noite num tampão de saturação a 4°C (10% de leite morno, 0,1% de Triton X100 em PBS) e incubada durante 90 minutos com 1:2000 de diluição de Ig de anti-ratinho marcado com peroxidase de rábano. A membrana foi lavada duas vezes com 0,1% de Triton X100 em PBS e desenvolvida com Substrato Opti-4CN (Bio-Rad). A reacção foi parada por adição de água.

As OMVs foram preparadas como se segue: deixou-se a estirpe *N. meningitidis* 2996 desenvolver durante a noite a 37°C com CO₂ a 5% em placas GC, recolhidas com um gancho e ressuspensa em 10ml de Tris-HCl a 20mM, pH 7,5, EDTA 2mM. A

inactivação pelo calor foi realizada a 56°C durante 45 minutos e as bactérias destruídas por sonicação durante 5 minutos em gelo (50% de ciclo de trabalho, 50% de produção, sonificador Branson microtip 3mm). As células não corrompidas foram removidas por centrifugação a 5000 g durante 10 minutos, o sobrenadante contendo a fracção de envelope celular total recuperado, e centrifugado ainda mais durante a noite a 50000g, à temperatura de 4°C. O pellet contendo as membranas foi ressuspensão em 2% de sarkozil, 20mM de Tris-HCl, pH7,5, 2mM de EDTA e incubado à temperatura ambiente durante 20 minutos para solubilizar as membranas internas. A suspensão foi centrifugada a 10000g durante 10 minutos para remover os agregados, o sobrenadante foi ainda centrifugado a 50000 g durante 3 horas. O pellet, contendo as membranas externas, foi lavado em PBS e ressuspensão no mesmo tampão. A concentração da proteína foi medida pelo ensaio de proteínas da D.C. Bio-Rad (Método Modificado Lowry), utilizando BSA como padrão.

Os extractos celulares totais foram preparados como se segue: a estirpe *N. meningitidis* 2996 foi deixada crescer durante a noite numa placa GC, recolhida com uma argola e ressuspensa em 1 ml de Tris-HCl 20mM. A inactivação pelo calor foi realizada a 56°C durante 30 minutos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Chiron SpA

<120> Expressão Híbrida de Proteínas de Neisseria

<130> P026783wo

<140> PCT/IB01/00420

<141> 2001-02-28

<150> GB 0004695.3

<151> 2000-02-28

<150> GB 0027675.8

<151> 2000-11-13

<160> 121

<170> SeqWin99, versão 1.02

<210> 1

<211> 608

<212> PRT

<213> Neisseria meningitis

<400> 1

<110> Chiron SpA

<120> Hybrid Expression of Neisserial Proteins

<130> P026783WO

<140> PCT/IB01/00420

<141> 2001-02-28

<150> GB 0004695.3

<151> 2000-02-28

<150> GB 0027675.8

<151> 2000-11-13

<160> 121

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 608

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

```
Leu Gly Ile Ser Arg Lys Ile Ser Leu Ile Leu Ser Ile Leu Ala Val
1           5           10           15

Cys Leu Pro Met His Ala His Ala Ser Asp Leu Ala Asn Asp Ser Phe
20          25          30

Ile Arg Gln Val Leu Asp Arg Gln His Phe Glu Pro Asp Gly Lys Tyr
35          40          45

His Leu Phe Gly Ser Arg Gly Glu Leu Ala Glu Arg Ser Gly His Ile
50          55          60

Gly Leu Gly Lys Ile Gln Ser His Gln Leu Gly Asn Leu Met Ile Gln
65          70          75          80

Gln Ala Ala Ile Lys Gly Asn Ile Gly Tyr Ile Val Arg Phe Ser Asp
85          90          95

His Gly His Glu Val His Ser Pro Phe Asp Asn His Ala Ser His Ser
100         105         110

Asp Ser Asp Glu Ala Gly Ser Pro Val Asp Gly Phe Ser Leu Tyr Arg
115         120         125

Ile His Trp Asp Gly Tyr Glu His His Pro Ala Asp Gly Tyr Asp Gly
130         135         140

Pro Gln Gly Gly Gly Tyr Pro Ala Pro Lys Gly Ala Arg Asp Ile Tyr
145         150         155         160
```

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

Asn Lys Leu Thr Thr Arg Glu Gln Val Glu Lys Asn Val Gln Glu Ile
 465 470 475 480
 Arg Asn Gly Asn Lys Asn Ser Asn Phe Ser Gln His Ala Gln Leu Glu
 485 490 495
 Arg Glu Ile Asn Lys Leu Lys Ser Ala Asp Glu Ile Asn Phe Ala Asp
 500 505 510
 Gly Met Gly Lys Phe Thr Asp Ser Met Asn Asp Lys Ala Phe Ser Arg
 515 520 525
 Leu Val Lys Ser Val Lys Glu Asn Gly Phe Thr Asn Pro Val Val Glu
 530 535 540
 Tyr Val Glu Ile Asn Gly Lys Ala Tyr Ile Val Arg Gly Asn Asn Arg
 545 550 555 560
 Val Phe Ala Ala Glu Tyr Leu Gly Arg Ile His Glu Leu Lys Phe Lys
 565 570 575
 Lys Val Asp Phe Pro Val Pro Asn Thr Ser Trp Lys Asn Pro Thr Asp
 580 585 590
 Val Leu Asn Glu Ser Gly Asn Val Lys Arg Pro Arg Tyr Arg Ser Lys
 595 600 605

<210> 2
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287

<400> 2

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

Ser	Ser	Gln	Pro	Ala	Asn	Gln	Pro	Asp	Met	Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Gly	115	120	125
Met	Gln	Gly	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Asn	Ala	Gly	Asn	Thr	130	135	140
Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Asn	Gln	Ala	Gly	Asn	Asn	Gln	Ala	Ala	Gly	Ser	145	150	155
Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly	Ser	165	170	175
Asn	Phe	Gly	Arg	Val	Asp	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	180	185	190
Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Cys	Ser	Gly	195	200	205
Asn	Asn	Phe	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Ser	Glu	Phe	Glu	Lys	210	215	220
Leu	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys	Ile	Ser	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly	Lys	Asn	225	230	235
Asp	Lys	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Asp	Ser	Val	Gln	Met	Lys	Gly	Ile	245	250	255
Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Phe	Tyr	Lys	Pro	Lys	Pro	Thr	Ser	Phe	Ala	Arg	260	265	270
Phe	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Met	Pro	275	280	285
Leu	Ile	Pro	Val	Asn	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Val	Asp	Gly	Glu	Ala	290	295	300
Val	Ser	Leu	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Ile	Phe	Ala	Pro	Glu	Gly	Asn	305	310	315
Tyr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu	Lys	Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	325	330	335
Ala	Leu	Arg	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly	Glu	Met	Leu	Ala	Gly	340	345	350
Ala	Ala	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	His	Phe	His	Thr	Glu	Asn	Gly	355	360	365
Arg	Pro	Tyr	Pro	Thr	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Gly	370	375	380
Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Met	385	390	395
Gly	Thr	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Gly	Asn	Gly	Phe	Lys	Gly	405	410	415

Thr	Trp	Thr	Glu	Asn	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Ser	Gly	Lys	Phe	Tyr	Gly
			420					425					430		
Pro	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Pro	Thr	Asp
		435					440					445			
Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Lys	Lys	Glu	Gln	Asp
450						455					460				

<210> 3
 <211> 2505
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287-919

<400> 3

atggctagcc	ccgatgttaa	atcggcggac	acgctgtcaa	aaccggccgc	tcctgttgtt	60
gctgaaaaag	agacagaggt	aaaagaagat	gcgccacagg	caggttctca	aggacagggc	120
gcgccatcca	cacaaggcag	ccaagatatg	gcggcagttt	cggcagaaaa	tacaggcaat	180
ggcgggtgagg	caacaacgga	caaacccaaa	aatgaagacg	agggaccgca	aatgatatg	240
ccgcaaaatt	ccgcggaatc	cgcaaatcaa	acaggggaaca	accaaccgca	cgatctctca	300
gattccgccc	ccgcgtcaaa	ccctgcacct	gcgaatggcg	gtagcaattt	tgggaagggtt	360
gatttggcta	atggcggtttt	gattgatggg	ccgtcgcaaa	atataacgtt	gacccactgt	420
aaaggcgatt	cttgtaatgg	tgataattta	ttggatgaag	aagcaccgtc	aaaaacagaa	480
tttgaataat	taaatgagtc	tgaaacgaat	gagaaatata	agaaagatgg	gaaaagcgat	540
aaatttacta	atttgggttc	gacagcagtt	caagctaatt	gaactaaca	atatgtcatc	600
atttataaag	acaagtcgca	ttcatcttca	tcgtcgcgat	tcaggcggtc	tgcacgggtc	660
aggaggtcgc	ttcttgccga	gatgcgcgta	atccccgtca	atcaggcgga	tacgctgatt	720
gtcgtatggg	aagcgggtcag	cctgacgggg	cattccggga	atatcttcgc	gcccgaaggg	780
aattacgggt	atctgactta	cggggcggga	aaattgcccc	gcggatcgta	tgcctccgt	840
gtgcaaggcg	aacgggcaaa	aggcgaaatg	cttgctggca	cggccgtgta	caacggcgaa	900
gtgctgcatt	ttcatacgga	aaacggccgt	ccgtaccgga	ctagaggcag	gtttgcgcga	960
aaagtgcatt	tcggcagcaa	atctgtggac	ggcattatcg	acagcggcga	tgatattgat	1020
atgggtacgc	aaaaattcaa	agccgccatc	gatggaaacg	gctttaaggg	gacttggacg	1080
gaaaatggcg	gcggggatgt	ttccggaagg	ttttacggcc	cggccggcga	ggaagtggcg	1140
ggaaaataca	gctatcgccc	gacagatcgc	gaaaagggcg	gattcggcgt	gtttgcccgc	1200
aaaaaagagc	aggatggatc	cggaggagga	ggatgccaaa	gcaagagcat	ccaaaccttt	1260
ccgcaacccg	acacatccgt	catcaacggc	ccggaccggc	cggtcggcat	ccccgacccc	1320
gccggaacga	cggtcggcgg	cggcggggcc	gtctataccg	ttgtaccgca	cctgtccctg	1380
ccccactggg	cggcgagga	tttcgcaaaa	agcctgcaat	ccttcgcctt	cggctgcgcc	1440
aatttgaaaa	accgccaagg	ctggcaggat	gtgtgcggcc	aagcctttca	aacccccgtc	1500
cattcctttc	aggcaaaaaca	gttttttgaa	cgtattttca	cgcctgggca	ggttgacggc	1560
aaagggaagc	ttgcccgtac	ggttaccggc	tattacgagc	cggctgctga	ggcgacgac	1620
aggcgagcgg	cacaagcccg	cttcccgatt	tacggtattc	ccgacgattt	tatctccgtc	1680
ccctgcctg	ccggttttgc	gagcggaaaa	gcccttgtec	gcacagggca	gacgggaaaa	1740
aacagcggca	caatcgacaa	taccggcgcc	acacataccg	ccgacctctc	cogattcccc	1800
atcacgcgcg	gcacaacggc	aatcaaaagg	aggtttgaag	gaagcccgct	cctccccctac	1860
cacacgcgca	accaaatcaa	cggcggcggc	cttgacggca	aagccccgat	actcgggtac	1920
ccggaagacc	ccgtcgaaat	tttttttatg	cacatccaa	gctcggggcg	tctgaaaacc	1980
cgcgcgggca	aatacatccg	catcggttat	gccgacaaaa	acgaacatcc	ctacgtttcc	2040
atcgagcget	atatggcgga	caaaggctac	ctcaagctcg	ggcagacctc	gatgcagggc	2100
atcaaaagcct	atatgcggca	aaatccgcaa	cgcctcgccg	aagttttggg	tcaaaacccc	2160
agctatatct	ttttccgcga	gcttgccgga	agcagcaatg	acgggtcccg	cggcgccactg	2220
ggcacgcccgt	tgatggggga	atatgcccgc	gcagtcgacc	ggcactacat	taccttgggc	2280
gcgcccttat	ttgtcgccac	cgcceatccg	gttaccgcga	aagccctcaa	ccgcctgatt	2340
atggcgagcg	ataccggcag	cgcgattaaa	ggcgcgggtg	gcgtggatta	tttttgggga	2400
tacggcgagc	aagccggcga	acttgccggc	aaacagaaaa	ccacgggtta	cgtctggcag	2460
ctcctaccca	acggtatgaa	gcccgaatac	cgcgcgtaac	tcgag		2505

<210> 4
 <211> 832
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287-819

<400> 4

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

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

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

<210> 5
 <211> 1746
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287-953

<400> 5

```

atggctagcc cccgatgttaa atcggcggac acgctgtcaa aaccggccgc tccctgttgtt 60
gctgaaaaag agacagaggt aaaagaagat gcgccacagg caggttctca aggacagggc 120
gcgccatcca cacaaggcag ccaagatatg cgggcagttt cggcagaaaa tacaggcaat 180
ggcgggtgcg caacaacgga caaacccaaa aatgaagacg agggaccgca aaatgatatg 240
ccgcaaaaatt ccgcgcgaat cgcgaatcaa acaggggaaca accaaccgcg cgattcttca 300
gatttcgccc ccgcgtcaaa cctgcaccc gcgaatggcg gtagcaattt tggaagggtt 360
gatttggtcta atggcgtttt gattgatggg ccgtcgcaaa atataacgtt gaccactgtt 420
aaaggcgatt ctgtaatgg tgataattta ttggatgaag aagcaccgtc aaaatcagaa 480
tttgaataatt taaatgagtc tgaacgaatt gagaaatata agaaagatgg gaaaagcgat 540
aaatttacta atttggttgc gacagcagtt caagctaatt gaactaaca atattgtcatc 600
atttataaag acaagtcgcg ttcattcttc totgcgcgat tcaggcggtc tgcacggctc 660
aggaggtcgc ttctgcccga gatgcgcgta atccccgtca atcaggcgga tacgtgtatt 720
gtcgatgggg aagcgggtcag cctgacgggg cattccggca atatcttcgc gcccgaaggg 780
aattaccggt atctgactta cggggcgga aaattgcccg gcggatcgta tgccctccgt 840
gtgcaaggcg aaccggcaaa aggcgaaatg ctgtctggca cggccgtgta caacggcgaa 900
gtgctgcatt ttcatacggg aaacggccgt ccgtacccga ctagggcag gtttgccgca 960
aaagtgcatt tcggcagcaa atctgtggac ggcattatcg acagcggcga tgatttgcac 1020
atgggtacgc aaaaattcaa agccgccatc gatggaaacg gctttaaggg gacttggacg 1080
gaaaatggcg gcgggatgt ttccggaagg ttttacggcc cggccggcga ggaagtggcg 1140
ggaaaataca gctatcgccc gacagatcgc gaaaaggcg gattcggcgt gtttgccggc 1200
aaaaaagagc aggatggatc cggaggagga ggagccacct acaaagtgga cgaatatcac 1260
gccaacgccc gtttcgccat cgaccatttc aacaccagca ccaacgtcgg cggtttttac 1320
ggtctgaccg gttcgttoga gttcgaccaa gcaaaacgcg acggtaaaaat cgacatcac 1380
atccccgttg ccaacctgca aagcggttcg caacacttta ccgaccacct gaaatcagcc 1440
gacatcttcg atgcccgcga atatccggac atccgctttg ttccaccaa attcaacttc 1500
aacggcaaaa aactggttcc cgttgacggc aacctgacca tgcacggcaa aaccgcccc 1560
gtcaaaactca aagccgaaaa attcaactgc taccaaagcc cgatggcgaa aaccgaagtt 1620
tgccggcgcg acttcagcac caccatcgac cgcacaaaat gggcggtgga ctacctcgtt 1680
aacgttggtg taaccaaaaag cgtccgcata gacatccaaa tcgaggcagc caaacaataa 1740
ctcgag 1746

```

<210> 6
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287-953

<400> 6

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu Val Lys Glu Asp Ala Pro
 20 25 30
 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Thr Gln Gly Ser Gln
 35 40 45
 Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
 50 55 60
 Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met
 65 70 75 80
 Pro Gln Asn Ser Ala Glu Ser Ala Asn Gln Thr Gly Asn Asn Gln Pro
 85 90 95
 Ala Asp Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn
 100 105 110
 Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile
 115 120 125
 Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser
 130 135 140
 Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu
 145 150 155 160
 Phe Glu Asn Leu Asn Glu Ser Glu Arg Ile Glu Lys Tyr Lys Lys Asp
 165 170 175
 Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val Ala Thr Ala Val Gln Ala
 180 185 190
 Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser
 195 200 205
 Ser Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu
 210 215 220
 Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile
 225 230 235 240
 Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe
 245 250 255
 Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu
 260 265 270
 Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly
 275 280 285
 Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe
 290 295 300
 His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala
 305 310 315 320
 Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly
 325 330 335
 Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly

			340				345				350				
Asn	Gly	Phe	Lys	Gly	Thr	Trp	Thr	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly	Asp	Val	Ser
		355					360					365			
Gly	Arg	Phe	Tyr	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ser
	370					375					380				
Tyr	Arg	Pro	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gly
385					390					395					400
Lys	Lys	Glu	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Lys	Val
				405					410					415	
Asp	Glu	Tyr	His	Ala	Asn	Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Asp	His	Phe	Asn	Thr
			420					425					430		
Ser	Thr	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Tyr	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Val	Glu	Phe
		435					440					445			
Asp	Gln	Ala	Lys	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Asp	Ile	Thr	Ile	Pro	Val	Ala
	450					455					460				
Asn	Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Gln	His	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Ser	Ala
465					470					475					480
Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Pro	Asp	Ile	Arg	Phe	Val	Ser	Thr
			485						490					495	
Lys	Phe	Asn	Phe	Asn	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ser	Val	Asp	Gly	Asn	Leu
			500					505					510		
Thr	Met	His	Gly	Lys	Thr	Ala	Pro	Val	Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Lys	Phe
		515					520					525			
Asn	Cys	Tyr	Gln	Ser	Pro	Met	Ala	Lys	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Asp
	530					535					540				
Phe	Ser	Thr	Thr	Ile	Asp	Arg	Thr	Lys	Trp	Gly	Val	Asp	Tyr	Leu	Val
545					550					555					560
Asn	Val	Gly	Met	Thr	Lys	Ser	Val	Arg	Ile	Asp	Ile	Gln	Ile	Glu	Ala
				565					570					575	
Ala	Lys	Gln													

<210> 7
 <211> 2388
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287-961

<400> 7

atggctagcc cccgatgttaa atcggggggac acgctgtcaa aaccggccgc tccgtgtgtt 60

```

gctgaaaaag agacagaggt aaaagaagat gggccacagg caggttctca aggacagggc 120
ggcccatcca cacaaggcag ccaagatatg ggggcagttt cggcagaaaa tacaggcaat 180
ggcgggtcgg caacaacgga caaacccaaa aatgaagacg agggaccgca aaatgatatg 240
ccgcaaaatt ccgccgaatc cgcaaatcaa acagggaaca accaaccgcg cgattcttca 300
gattccgccc ccgcgtcaaa cctgcacct ggcgaatggc gtagcaattt tggaaggggt 360
gatttggcta atggcgtttt gattgatggg ccgtcgcaaa atataacgtt gacccactgt 420
aaaggcgatt cttgtaatgg tgataattta ttggatgaag aagcaccgtc aaaatcagaa 480
tttgaaaaatt taaatgagtc tgaacgaatt gagaaatata agaaagatgg gaaaagcgat 540
aaatttacta atttgggttg gacagcagtt caagctaatt gaactaacia atatgtcatc 600
atttataaag acaagtcgcg ttcatcttca tctgcgcgat tcaggcgttc tgcacggctg 660
aggagggtcg ttctgcgga gatgcgccta atccccgtca atcaggcgga tacgctgatt 720
gtcgatgggg aagcgggtcag cctgacgggg cattccggca atatcttcgc gcccggaagg 780
aattaccggt atctgactta cggggcgga aaattgccc ggggatcgta tgcctccgt 840
gtgcaaggcg aacgggcaaa aggcgaatg cttgctggca cggccgtgta caacggcgaa 900
gtgctgcatt ttcatcggg aaacggccgt ccgtaccgca ctaggggcag gtttgcgca 960
aaagtcgatt tggcgagcaa atctgtggac ggcattatcg acagcggcga tgatttgcatt 1020
atgggtacgc aaaaattcaa agccgcctac gatggaaacg gctttaaggg gacttggacg 1080
gaaaatggcg ggggggatgt ttccggaagg tttaacggcc cggccggcga ggaagtggcg 1140
ggaaaataca gctatcgccc gacagatgcg gaaaaggcg gattcggcg gtttgcggcg 1200
aaaaaagagc aggatggatc cggaggagga ggagccacaa acgacgacga tgttaaaaaa 1260
gctgccactg tggccattgc tgcctgctac aacaatggcc aagaatcaa cgggtttcaa 1320
gctggagaga ccattctacg cattgatgaa gacggcacia ttacccaaaa agacgcaact 1380
cgagccgatg ttgaagcaga cgactttaaa ggtctgggtc tgaaaaaagt cgtgactaac 1440
ctgaccaaaa ccgtcaatga aaacaaacaa aacgtcgatg ccaaagttaa agctgcagaa 1500
tctgaaatag aaaaagttaac aaccaagtta gcagacactg atgcccgttt agcagatact 1560
gatgccgctc tggatgcaac caccacgccc ttgaataaat tgggagaaaa tataacgaca 1620
tttgctgaag agactaagac aaatatcgta aaatttgatg aaaaattaga agccgtggct 1680
gataccgctc acaagcatgc cgaagcattc aacgatatcg ccgattcatt ggatgaaacc 1740
aacactaagg cagacgaagc cgtcaaaacc gccaatgaag ccaaacagac ggccgaagaa 1800
accaaacaaa acgtcgatgc caaagtaaaa gctgcagaaa ctgcagcagg caaagccgaa 1860
gctgccgctg gcacagctaa tactgcagcc gacaaggccg aagctgtcgc tgcaaaagtt 1920
accgacatca aagctgatat cgctacgaac aaagataata ttgctaaaaa agcaaacagt 1980
gccgacgtgt acaccagaga agagtctgac agcaaatgtg tcagaattga tggctctgaa 2040
gctactaccg aaaaattgga cacacgcttg gcttctgctg aaaaatccat tgcgcatcac 2100
gatactcgcc tgaacggttt ggataaaaca gtgtcagacc tgcgcaaga aaccgcgcaa 2160
ggccttgtag aacaagccgc gctctcgggt ctgttccaac cttacaacgt gggtcgggtt 2220
aatgtaacgg ctgcagtcgg cggctacaaa tccgaatcgg cagtcgccat cggtaaccgg 2280
ttccgcttta ccgaaaactt tgcgcgcaaa gcaggcgtgg cagtcggcac ttcgtccggt 2340
tcttccgagc cctaccatgt cggcgtaaat tacgagtggt aactcgag 2388

```

<210> 8
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287-961

<400> 8

```

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
1          5          10         15

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

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

```

Asp	Met	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Glu	Asn	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Ala		
50						55					60						
Thr	Thr	Asp	Lys	Pro	Lys	Asn	Glu	Asp	Glu	Gly	Pro	Gln	Asn	Asp	Met		
65					70					75					80		
Pro	Gln	Asn	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Asn	Gln	Thr	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro		
				85					90					95			
Ala	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ala	Pro	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn		
			100					105					110				
Gly	Gly	Ser	Asn	Phe	Gly	Arg	Val	Asp	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Ile		
		115					120					125					
Asp	Gly	Pro	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser		
130						135					140						
Cys	Asn	Gly	Asp	Asn	Leu	Leu	Asp	Glu	Glu	Ala	Pro	Ser	Lys	Ser	Glu		
145					150					155					160		
Phe	Glu	Asn	Leu	Asn	Glu	Ser	Glu	Arg	Ile	Glu	Lys	Tyr	Lys	Lys	Asp		
				165					170						175		
Gly	Lys	Ser	Asp	Lys	Phe	Thr	Asn	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Val	Gln	Ala		
			180					185					190				
Asn	Gly	Thr	Asn	Lys	Tyr	Val	Ile	Ile	Tyr	Lys	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser		
		195					200					205					
Ser	Ser	Ser	Ala	Arg	Phe	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu		
210						215					220						
Pro	Ala	Glu	Met	Pro	Leu	Ile	Pro	Val	Asn	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile		
225					230					235				240			
Val	Asp	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Ile	Phe		
				245					250					255			
Ala	Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu	Lys	Leu		
			260					265					270				
Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Leu	Arg	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly		
		275					280					285					
Glu	Met	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	His	Phe		
290						295					300						
His	Thr	Glu	Asn	Gly	Arg	Pro	Tyr	Pro	Thr	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Ala		
305					310					315					320		
Lys	Val	Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser	Gly		
				325					330					335			
Asp	Asp	Leu	His	Met	Gly	Thr	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Gly		
			340					345					350				

Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser
 355 360 365
 Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly
 385 390 395 400
 Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Asn Asp Asp
 405 410 415
 Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn
 420 425 430
 Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile
 435 440 445
 Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val
 450 455 460
 Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn
 465 470 475 480
 Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val
 485 490 495
 Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp
 500 505 510
 Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr
 515 520 525
 Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu
 530 535 540
 Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys Leu Glu Ala Val Ala
 545 550 555 560
 Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn Asp Ile Ala Asp Ser
 565 570 575
 Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala Val Lys Thr Ala Asn
 580 585 590
 Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys
 595 600 605
 Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala Gly
 610 615 620
 Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala Val Ala Ala Lys Val
 625 630 635 640
 Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys Asp Asn Ile Ala Lys
 645 650 655

Lys	Ala	Asn	Ser	Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	Lys
			660					665					670		
Phe	Val	Arg	Ile	Asp	Gly	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Leu	Asp	Thr
		675					680					685			
Arg	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp	His	Asp	Thr	Arg	Leu
	690					695					700				
Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	Gln
705					710					715					720
Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn
				725					730					735	
Val	Gly	Arg	Phe	Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ser	Glu
			740					745					750		
Ser	Ala	Val	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Phe	Arg	Phe	Thr	Glu	Asn	Phe	Ala
		755					760					765			
Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala
	770					775					780				
Tyr	His	Val	Gly	Val	Asn	Tyr	Glu	Trp							
785					790										

<210> 9
 <211> 2700
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> deltaG287NZ-919

 <400> 9

atggctagcc	ccgatgtcaa	gtcggcggac	acgctgtcaa	aacctgccgc	ccctgttgtt	60
tctgaaaaag	agacagaggg	aaaggaagat	gogccacagg	caggttctca	aggacagggc	120
gcgccatccg	cacaaggcgg	tcaagatatg	gcggcggltt	cggaagaaaa	tacaggcaat	180
ggcgggtgcg	cagcaacgga	caaaccctaa	aatgaagacg	agggggcgca	aatgatgatg	240
ccgcaaaaatg	ccgccgatac	agatagtttg	acaccgaatc	acaccccggc	ttcgaatatg	300
ccggccggaa	atatggaaaa	ccaagcaccg	gatgccgggg	aatcgagaca	gccggcaaac	360
caaccggata	tggcaaatat	ggcggacgga	atgcagggtg	acgatccgtc	ggcaggcggg	420
gaaaatgccg	gcaatacggc	tgcccaaggt	acaaatcaag	ccgaaaacaa	tcaaaccgcc	480
ggttctcaaa	atcctgcctc	ttcaaccaat	cctagcgcca	cgaatagcgg	tggtgatttt	540
ggaaggacga	acgtgggcaa	ttctgttgtg	attgacgggc	cgctcgaaaa	tataacgttg	600
accactgta	aaggcgattc	ttgtagtggc	aataatttct	tggatgaaga	agtagacgta	660
aaatcagaat	ttgaaaaatt	aagtgatgca	gacaaaataa	gtaattacaa	gaaagatggg	720
aagaatgacg	ggaagaatga	taaaatttgc	ggtttggttg	ccgatagtgt	gcagatgaag	780
ggaatcaatc	aatatattat	cttttataaa	cctaaaccca	cttcatttgc	gcgatttagg	840
cgttctgcac	ggtcgaggcg	gtcgtctccg	gccgagatgc	cgtgatctcc	cgtcaatcag	900
goggatacgc	tgattgtcga	tggggaagcg	gtcagcctga	cggggcattc	cggaatatc	960
ttcgcgcccc	aagggaatta	ccggtatctg	acttacgggg	cggaataatt	gcccgccgga	1020
tcgtatgccc	tccgtgttca	aggcgaacct	tcaaaaggcg	aaatgctcgc	gggcacggca	1080
gtgtacaaac	gcgaagtgtc	gcattttcat	acggaaaacg	gccgtccgtc	cccgtccaga	1140
ggcagggtttg	ccgcaaaagt	cgatttcggc	agcaaatctg	tggacggcat	tatcgacagc	1200

ggcgatgggt	tgcataatggg	tacgcaaaaa	ttcaaagccg	ccatcgatgg	aaacggcttt	1260
aaggggactt	ggacggaaaa	tgccggcggg	gatgtttccg	gaaagtttta	cgccccggcc	1320
ggcgagggaag	tgccgggaaa	atacagctat	cgcccaacag	atgcggaaaa	gggaggatcc	1380
ggcgtgtttg	ccggcaaaaa	agagcaggat	ggatccggag	gaggaggatg	ccaaagcaag	1440
agcatecaaa	cctttccgca	acccgacaca	tccgtcatca	acggcccgga	ccggccgggtc	1500
ggcatccccg	accccgccgg	aacgacggtc	ggcggcgccg	gggcccgtca	taccgttgtta	1560
ccgcacctgt	cctgtcccca	ctggcgccgg	caggatttcc	ccaaaagcct	gcaatccttc	1620
cgccctcggt	gcgcccaattt	gaaaaaccgc	caaggctggc	aggatgtgtg	cgcccaagcc	1680
tttcaaaccc	ccgtccattc	ctttcaggca	aaacagtttt	ttgaacgcta	tttcacgccg	1740
tgccaggttg	caggcaacgg	aagccttgcc	ggtaagggtta	ccggctatta	cgagccgggtg	1800
ctgaaggggc	acgacaggcg	gacggcacaa	gcccgccttc	cgattttacg	tattcccgac	1860
gatttttatct	cgtccccctt	gcctgccggt	ttgcggagcg	gaaaagccct	tgtccgcata	1920
aggcagacgg	gaaaaaacag	cggcacaaac	gacaataccg	gcccgcacaca	taccgcccag	1980
ctctcccgat	tccccatcac	cgcgcgcaca	acggcaatca	aaggcaggtt	tgaaggaagc	2040
cgcttctctc	cctaccacac	gcgcaaccac	atcaacggcg	gcgcgcttga	cggcaaaagcc	2100
ccgatactcg	gttacgcgca	agaccccgtc	gaactttttt	ttatgcacat	ccaaggctcg	2160
ggccgtctga	aaaccccgtc	cggcaaatat	atccgcacgc	gctatgccga	caaaaacgaa	2220
catccctacg	tttccatcgg	acgctatatg	gcggacaaaag	gctacctcaa	gctcgggcag	2280
acctcgatgc	aggcgcataa	agcctatatg	cgcaaaaatc	cgcaacgcct	cgccgaagtt	2340
ttgggtcaaa	accccagcta	tatctttttc	cgcgagcttg	ccggaagcag	caatgacggc	2400
cccgtcggcg	cactgggcac	gccgttgatg	ggggaatatg	ccggcgccag	cgaccggcac	2460
tacattacct	tgggcgcgcc	cttatttctc	gccaccgccc	atccggttac	ccgcaaaagcc	2520
ctcaaccgcc	tgatttatggc	gcaggatacc	ggcagcgccg	ttaaaggcgc	ggtgcgcgtg	2580
gattattttt	ggggatacgg	cgacgaagcc	ggcgaacttg	ccggcaaaaca	gaaaaccacg	2640
ggttacgtct	ggcagctcct	acccaacggc	atgaagcccg	aataaccgcc	gtaaaagctt	2700

<210> 10
 <211> 897
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287NZ-019

<400> 10

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

115					120					125					
Asp	Gly	Met	Gln	Gly	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Glu	Asn	Ala	Gly
130					135					140					
Asn	Thr	Ala	Ala	Gln	Gly	Thr	Asn	Gln	Ala	Glu	Asn	Asn	Gln	Thr	Ala
145					150					155					160
Gly	Ser	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Asn	Pro	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser
				165					170					175	
Gly	Gly	Asp	Phe	Gly	Arg	Thr	Asn	Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Ile	Asp
			180					185					190		
Gly	Pro	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Cys
			195				200					205			
Ser	Gly	Asn	Asn	Phe	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Ser	Glu	Phe
	210					215					220				
Glu	Lys	Leu	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys	Ile	Ser	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly
225					230					235					240
Lys	Asn	Asp	Gly	Lys	Asn	Asp	Lys	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Asp	Ser
			245					250						255	
Val	Gln	Met	Lys	Gly	Ile	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Phe	Tyr	Lys	Pro	Lys
			260					265					270		
Pro	Thr	Ser	Phe	Ala	Arg	Phe	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser
			275				280					285			
Leu	Pro	Ala	Glu	Met	Pro	Leu	Ile	Pro	Val	Asn	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu
			290			295					300				
Ile	Val	Asp	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Ile
305					310					315					320
Phe	Ala	Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu	Lys
			325						330					335	
Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Leu	Arg	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	Ser	Lys
			340					345					350		
Gly	Glu	Met	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	His
			355				360					365			
Phe	His	Thr	Glu	Asn	Gly	Arg	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala
			370			375					380				
Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser
385					390					395					400
Gly	Asp	Gly	Leu	His	Met	Gly	Thr	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp
			405						410					415	
Gly	Asn	Gly	Phe	Lys	Gly	Thr	Trp	Thr	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly	Asp	Val

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

	725		730		735
Asp Lys Asn Glu His Pro Tyr Val Ser Ile Gly Arg Tyr Met Ala Asp					
	740		745		750
Lys Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Gln Thr Ser Met Gln Gly Ile Lys Ala					
	755		760		765
Tyr Met Arg Gln Asn Pro Gln Arg Leu Ala Glu Val Leu Gly Gln Asn					
	770		775		780
Pro Ser Tyr Ile Phe Phe Arg Glu Leu Ala Gly Ser Ser Asn Asp Gly					
	785		790		795
Pro Val Gly Ala Leu Gly Thr Pro Leu Met Gly Glu Tyr Ala Gly Ala					
	805		810		815
Val Asp Arg His Tyr Ile Thr Leu Gly Ala Pro Leu Phe Val Ala Thr					
	820		825		830
Ala His Pro Val Thr Arg Lys Ala Leu Asn Arg Leu Ile Met Ala Gln					
	835		840		845
Asp Thr Gly Ser Ala Ile Lys Gly Ala Val Arg Val Asp Tyr Phe Trp					
	850		855		860
Gly Tyr Gly Asp Glu Ala Gly Glu Leu Ala Gly Lys Gln Lys Thr Thr					
	865		870		875
Gly Tyr Val Trp Gln Leu Leu Pro Asn Gly Met Lys Pro Glu Tyr Arg					
	885		890		895

Pro

<210> 11
 <211> 1941
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287NZ-953

<400> 11

atggctagcc	ccgatgtcaa	gtcggcggac	acgctgtcaa	aacctgccgc	ccctgttgtt	60
tctgaaaaag	agacagaggg	aaaggaagat	gcgccacagg	caggttctca	aggacagggc	120
gcgccatccg	cacaaggcgg	tcaagatatg	gcggcggttt	cggaagaaaa	tacaggcaat	180
ggcgggtgcg	cagcaacgga	caaaccctaa	aatgaagacg	agggggcgca	aaatgatatg	240
ccgcaaaatg	ccgccgatac	agatagtttg	acaccgaatc	acaccccgcc	ttcgaatatg	300
ccggccggaa	atatggaaaa	ccaagcaccg	gatgccgggg	aatcggagca	gccggcaaac	360
caaccggata	tggcaaatat	ggcggacgga	atgcagggtg	acgatccgtc	ggcaggcggg	420
gaaaatgccg	gcaatacggc	tgcctcaagg	acaaatcaag	ccgaaaacaa	tcaaaccgcc	480
ggtttctcaa	atcctgcctc	ttcaaccaat	cctagcgcca	cgaatagcgg	tggtgatttt	540
ggaaggacga	acgtgggcaa	ttctgtttgt	attgacgggc	cgctcgcaaaa	tataacgttg	600
acccactgta	aaggcgattc	ttgtagtggc	aataatttct	tggatgaaga	agtacagcta	660
aaatcagaat	ttgaaaaatt	aagtgatgca	gacaaaataa	gtaattacaa	gaaagatggg	720
aagaatgacg	ggaagaatga	taaatttgtc	ggtttggttg	ccgatagtgt	gcagatgaag	780
ggaatcaatc	aatatattat	cttttataaa	cctaaaccca	cttcattttgc	gcgatttagg	840
cgttctgcac	ggtcagggcg	gtcgtttccg	gccgagatgc	cgctgattcc	cgtaaatcag	900
gcggatacgc	tgattgtoga	tggggaagcg	gtcagcctga	cggggcattc	cggcaatatc	960
ttcgcgcccc	aagggaatta	ccggtatctg	acttacgggg	cggaataatt	gccccggcga	1020
tcgatgccc	tccgtgttca	aggcgaacct	tcaaaaggcg	aaatgctcgc	gggcacggca	1080
gtgtacaacg	gcgaagtgtc	gcattttcat	acggaaaacg	gccgtccgtc	cccgtccaga	1140
ggcaggtttg	ccgcaaaagt	cgatttcggc	agcaaatctg	tggacggcat	tatcgacagc	1200
ggcgatgggt	tgcataatgg	tacgcaaaaa	ttcaaagccg	ccatcgatgg	aaacggcttt	1260
aaggggactt	ggacggaaaa	tggcggcggg	gatgtttccg	gaaagtttta	cggcccgccc	1320
ggcgaggaag	tggcgggaaa	atacagctat	cgcccaacag	atgcggaaaa	gggcggattc	1380
ggcgtgtttg	ccggcaaaaa	agagcaggat	ggatccggag	gaggaggagc	cacctacaaa	1440
gtggacgaat	atcacgccaa	cgcccgtttc	gccatcgacc	atttcaaac	cagcaccac	1500
gtcggcggtt	tttacgggtc	gacccgttcc	gtcgagtccg	accaagcaaa	acgcgacggc	1560
aaaatcgaca	tcaccatccc	cgttgccaac	ctgcaaacgc	gttcgcaaca	ctttaccgac	1620
cacctgaaat	cagccgacat	cttcgatgcc	gcccaatatc	cggacatccg	ctttgttttc	1680
accaaattca	acttcaacgg	caaaaaactg	gtttccgttg	acggcaacct	gacctgcac	1740
ggcaaaaccg	cccccgtaaa	actcaaagcc	gaaaaattca	actgctacca	aagcccgatg	1800
gcgaaaaccg	aagtttgccg	cggcgacttc	agcaccacca	tcgaccgcac	caaatggggc	1860
gtggactacc	tcgttaacgt	tggtatgacc	aaaagcgtcc	gcacgcacat	ccaaatcgag	1920
gcagccaaac	aataaaagct	t				1941

<210> 12

<211> 644

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> deltaG267NZ-953

<400> 12

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

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

Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460
 Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys
 465 470 475 480
 Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495
 Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510
 Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
 515 520 525
 Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540
 Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
 545 550 555 560
 Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
 565 570 575
 Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
 580 585 590
 Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
 595 600 605
 Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620
 Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640
 Ala Ala Lys Gln

<210> 13
 <211> 2583
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287NZ-961

<400> 13

atggctagcc	ccgatgtcaa	gtcggcggac	acgctgtcaa	aacctgccc	cctgttgtt	60
tctgaaaaag	agacagaggg	aaaggaagat	gcgccacagg	caggttctca	aggacagggc	120
gcgccatccg	cacaaggcgg	tcaagatatg	gcggcgggtt	cggagaaaa	tacaggcaat	180
ggcgggtcgg	cagcaacgga	caaaccocaa	aatgaagacg	agggggcgca	aaatgatatg	240
ccgcaaaatg	ccgccgatac	agatagtttg	acaccgaatc	acaccccgcc	ttcgaatatg	300
ccggccggaa	atatggaaaa	ccaagcaccg	gatgccgggg	aatcggagca	gccggcaaac	360
caaccggata	tggcaaatac	ggcggacgga	atgcagggtg	acgatccgtc	ggcaggcggg	420
gaaaatgccg	gcaatacggc	tgcccaaggt	acaaatcaag	ccgaaaaaaa	tcaaaccgcc	480
ggttctcaaa	atcctgcctc	ttcaaccaat	cctagcgcca	cgaatagcgg	tggtgatattt	540

ggaaggacga	acgtgggcaa	ttctgtttgt	attgacgggc	cgctcgcaaaa	tataacgttg	600
acccactgta	aaggcgattc	ttgtagtggc	aataatttct	tggatgaaga	agtacagcta	660
aaatcagaat	ttgaaaaatt	aagtgtatga	gacaaaataa	gtaattacaa	gaaagatggg	720
aagaatgacg	ggaagaatga	taaatttgtc	ggtttgtgtg	ccgatagtgt	gcagatgaag	780
ggaatcaatc	aatatattat	cttttataaa	cctaaaccca	cttcatttgc	gcgatttagg	840
cgttctgcac	ggtcgaggcg	gtcgcttccg	gccgagatgc	cgctgattcc	cgtcaatcag	900
gcggatacgc	tgattgtcga	tggggaagcg	gtcagcctga	cggggcattc	cggcaatatc	960
ttcgcgcccg	aagggaatta	ccggtatctg	acttacgggg	cggaaaaatt	gcccggcgga	1020
tcgtatgccc	tccgtgttca	agggcaacct	tcaaaaggcg	aaatgctcgc	gggcacggca	1080
gtgtacaacg	gcgaagtgtc	gcattttcat	acggaaaaac	gccgtccgtc	cccgtccaga	1140
ggcaggtttg	ccgcaaaagt	cgatttccgc	agcaaatctg	tggacggcat	tatcgacagc	1200
ggcgatgggt	tgcatatggg	tacgcaaaaa	ttcaaagccg	ccatcgatgg	aaacggcttt	1260
aaggggactt	ggacggaaaa	tggcgggggg	gatgtttccg	gaaagtttta	cggcccggcc	1320
ggcgagggaag	tggcgggaaa	atacagctat	cgcccaacag	atgcggaaaa	ggcgggattc	1380
ggcgtgtttg	ccggcaaaaa	agagcaggat	ggatccggag	gaggaggagc	cacaaacgac	1440
gacgatgtta	aaaaagctgc	cactgtggcc	attgctgctg	cctacaacaa	tggccaagaa	1500
atcaacgggt	tcaaagctgg	agagaccatc	tacgacattg	atgaagacgg	cacaattacc	1560
aaaaaagacg	caactgcagc	cgatgtttgaa	gccgacgact	ttaaaggtct	gggtctgaaa	1620
aaagtcgtga	ctaacctgac	caaaaccgtc	aatgaaaaaa	aacaaaaacg	cgatgccaaa	1680
gtaaaagctg	cagaatctga	aatagaaaag	ttaacaacca	agtttagcaga	cactgatgcc	1740
gcttttagcag	atactgatgc	cgtctctggat	gcaaccaacca	acgccttgaa	taaatgtggg	1800
gaaaatataa	cgacatttgc	tgaagagact	aagacaaata	tcgtaaaaat	tgatgaaaaa	1860
ttagaagccg	tggctgatac	cgctcgacaag	catgccgaag	cattcaacga	tatcgccgat	1920
tcatttggatg	aaaccaacac	taaggcagac	gaagccgtca	aaaccgccaa	tgaagccaaa	1980
cagacggccg	aagaaaccaa	acaaaacgtc	gatgccaaag	taaaagctgc	agaaactgca	2040
gcaggcaaaag	ccgaagctgc	cgctggcaca	gctaatactg	cagccgacaa	ggccgaagct	2100
gtcgttgcaa	aaagttaccga	catcaaagct	gatatcgcta	cgaacaaaga	taatatgtgt	2160
aaaaaagcaa	acagtgccga	cgtgtacacc	agagaagagt	ctgacagcaa	atttgtcaga	2220
attgatgggtc	tgaacgctac	taccgaaaaa	ttggacacac	gcttggtctc	tgttgaaaaa	2280
tccattgccc	atcacgatac	tgcctgaac	ggtttggata	aaacagtgtc	agacctgcgc	2340
aaagaaaccc	gccaaggcct	tgcagaacaa	gccgcgctct	ccggtctgtt	caaaccttac	2400
aacgtgggtc	ggttcaatgt	aacggctgca	gtcggcggct	acaaatccga	atcggcagtc	2460
gccatcggtg	ccggcttccg	ctttaccgaa	aactttgccg	ccaaagcagg	cgtggcagtc	2520
ggcacttcgt	ccggttcttc	cgcagcctac	catgtcggcg	tcaattacga	gtggtaaaag	2580
ctt						2583

<210> 14
 <211> 858
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> deltaG287NZ-961

<400> 14

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

Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met	65	70	75	80
Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro		85	90	95
Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala		100	105	110
Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala		115	120	125
Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly		130	135	140
Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala		145	150	155
Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser		165	170	175
Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp		180	185	190
Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys		195	200	205
Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe		210	215	220
Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly		225	230	235
Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser		245	250	255
Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys		260	265	270
Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser		275	280	285
Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu		290	295	300
Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile		305	310	315
Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys		325	330	335
Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys		340	345	350
Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His		355	360	365

Phe	His	Thr	Glu	Asn	Gly	Arg	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	370	375	380	
Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser	385	390	395	400
Gly	Asp	Gly	Leu	His	Met	Gly	Thr	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	405	410	415	
Gly	Asn	Gly	Phe	Lys	Gly	Thr	Trp	Thr	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly	Asp	Val	420	425	430	
Ser	Gly	Lys	Phe	Tyr	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr	435	440	445	
Ser	Tyr	Arg	Pro	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	450	455	460	
Gly	Lys	Lys	Glu	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Asn	Asp	465	470	475	480
Asp	Asp	Val	Lys	Lys	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asn	485	490	495	
Asn	Gly	Gln	Glu	Ile	Asn	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Asp	500	505	510	
Ile	Asp	Glu	Asp	Gly	Thr	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	515	520	525	
Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Leu	Gly	Leu	Lys	Lys	Val	Val	Thr	530	535	540	
Asn	Leu	Thr	Lys	Thr	Val	Asn	Glu	Asn	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	545	550	555	560
Val	Lys	Ala	Ala	Glu	Ser	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Thr	Thr	Lys	Leu	Ala	565	570	575	
Asp	Thr	Asp	Ala	Ala	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala	Leu	Asp	Ala	Thr	580	585	590	
Thr	Asn	Ala	Leu	Asn	Lys	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Phe	Ala	Glu	595	600	605	
Glu	Thr	Lys	Thr	Asn	Ile	Val	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ala	Val	610	615	620	
Ala	Asp	Thr	Val	Asp	Lys	His	Ala	Glu	Ala	Phe	Asn	Asp	Ile	Ala	Asp	625	630	635	640
Ser	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	645	650	655	
Asn	Glu	Ala	Lys	Gln	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	660	665	670	

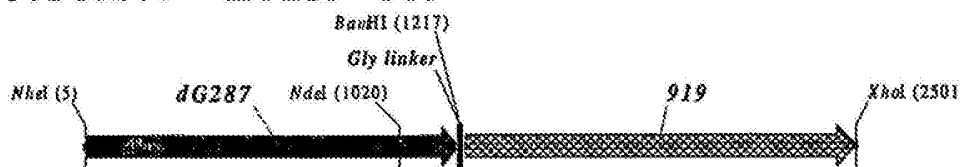
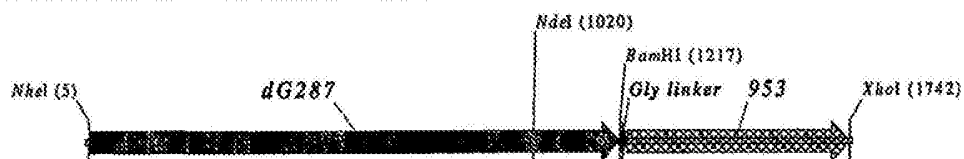
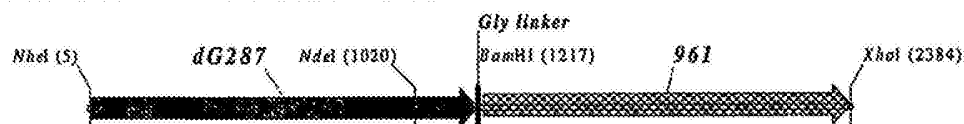
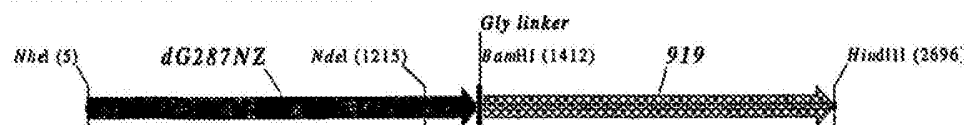
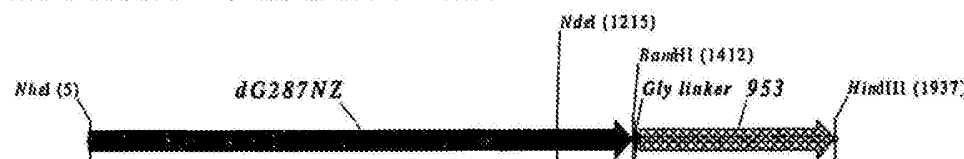
Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Glu	Thr	Ala	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	
	675						680					685				
Gly	Thr	Ala	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	
	690					695				700						
Val	Thr	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys	Asp	Asn	Ile	Ala	
705					710					715					720	
Lys	Lys	Ala	Asn	Ser	Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	
			725						730					735		
Lys	Phe	Val	Arg	Ile	Asp	Gly	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Leu	Asp	
		740						745					750			
Thr	Arg	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp	His	Asp	Thr	Arg	
	755						760					765				
Leu	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	
	770					775					780					
Gln	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	
785					790					795					800	
Asn	Val	Gly	Arg	Phe	Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ser	
				805					810					815		
Glu	Ser	Ala	Val	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Phe	Arg	Phe	Thr	Glu	Asn	Phe	
			820					825					830			
Ala	Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	
		835					840					845				
Ala	Tyr	His	Val	Gly	Val	Asn	Tyr	Glu	Trp							
	850					855										

Lisboa, 27 de Maio de 2008

REIVINDICAÇÕES

- 1- Uma proteína híbrida da fórmula $\text{NH}_2\text{-A-B-COOH}$, caracterizada por A compreender a proteína de *Neisseria* ΔG287 e B compreender a proteína de *Neisseria* 953, e sendo a sequência de aminoácido da proteína híbrida como descrito na SEA ID N°:6, ou sendo uma sequência com uma identidade de sequência superior a 70% em relação à mesma.
- 2- A proteína, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizada por a ΔG287 ser proveniente da estirpe 2996 da *N.meningitidis* ou da estirpe 394/98 da *N.meningitidis*.
- 3- A proteína, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizada por A e B serem da mesma estirpe da *N.meningitidis*.
- 4- A proteína, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizada por a sequência de aminoácido ser descrita na SEQ ID N°:6.

Lisboa, 27 de Maio de 2008

FIGURA 1 — ΔG287—919**FIGURA 2 — ΔG287—953****FIGURA 3 — ΔG287—961****FIGURA 4 — ΔG287NZ—919****FIGURA 5 — ΔG287NZ—953****FIGURA 6 — ΔG287NZ—961**