

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

(22) Data de pedido: 2001.02.28	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L. VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA (SI)	IT
(30) Prioridade(s): 2000.02.28 GB 0004695 2000.11.13 GB 0027675		
(43) Data de publicação do pedido: 2011.01.05	(72) Inventor(es): MARIA B. ARICO MAURIZIO COMANDUCCI CESIRA GALEOTTI VEGA MASIGNANI MARZIA MONICA GIULIANI	IT IT IT IT IT
(45) Data e BPI da concessão: 2012.05.23 141/2012	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE NEISSERIA**

(57) Resumo:

ABORDAGENS ALTERNATIVAS E MELHORADAS À EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS DE NEISSERIA MENINGITIDIS E NEISSERIA GONORRHOEAE. ESTAS ABORDAGENS TIPICAMENTE AFECTAM O NÍVEL DE EXPRESSÃO, A FACILIDADE DE PURIFICAÇÃO, A LOCALIZAÇÃO CELULAR, E/OU AS PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS DA PROTEÍNA EXPRESSA.

RESUMO**"EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE NEISSERIA"**

Abordagens alternativas e melhoradas à expressão heteróloga das proteínas de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Estas abordagens tipicamente afectam o nível de expressão, a facilidade de purificação, a localização celular, e/ou as propriedades imunológicas da proteína expressa.

DESCRIÇÃO

"EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE NEISSERIA"

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção insere-se no campo da expressão de proteínas. Em particular, refere-se à expressão heteróloga de proteínas de *Neisseria* (por exemplo, *N. gonorrhoeae* ou, preferentemente, *N. meningitidis*).

ANTECEDENTES

Os pedidos de patente internacional W099/24578, W099/36544, W099/57280 e W000/230 revelam proteínas de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Estas proteínas são tipicamente descritas como sendo expressas em *E. coli* (isto é, expressão heteróloga) como fusões de GST N terminal ou fusões de cauda de His C terminal, embora outros sistemas de expressão, incluindo a expressão em *Neisseria* nativa, sejam também revelados.

É um objecto da presente invenção proporcionar uma abordagem alternativa e melhorada para a expressão heteróloga de estas proteínas. Esta abordagem afectará tipicamente o nível de expressão, a facilidade de purificação, a localização celular de expressão, e/ou as propriedades imunológicas da proteína expressa.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Nomenclatura no presente documento

As convenções de denominação usadas no documento W099/57280 são usadas no presente documento (por exemplo, 'm287', 'g287' e 'a287' etc.).

Sequências

A invenção também proporciona uma proteína ou um ácido nucleico que tem qualquer uma das sequências estabelecidas nos seguintes exemplos. Também proporciona proteínas e ácido nucleico que tem identidade de sequências a estas. O grau de 'identidade de sequências' é preferentemente mais

de 50 % (por exemplo, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % ou mais).

Identidade é preferentemente determinada pelo algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman como é implementado no programa de MPSRCH (Oxford Molecular), usando uma pesquisa de lacuna afim com parâmetros *penalidade de lacuna aberta* = 12 e *penalidade de extensão de lacuna* = 1. Tipicamente, 50 % de identidade ou mais entre duas proteínas é considerado como sendo uma indicação de equivalência funcional.

Além disso, a invenção proporciona ácido nucleico que pode hibridar ao ácido nucleico revelado nos exemplos, preferentemente sob condições de "alta restringência" (por exemplo, 65C num 0,1xSSC, 0,5 % de solução de SDS).

A invenção também proporciona ácido nucleico que codifica proteínas de acordo com a invenção.

Deve também ser apreciado que a invenção proporciona ácido nucleico que compreende sequências complementares a aquelas descritas anteriormente (por exemplo, para antissense ou propósitos de sondagem).

Ácido nucleico de acordo com a invenção pode, claro, ser preparado de muitas maneiras (por exemplo, por meio de síntese química, a partir de bibliotecas genômicas ou de ADNc, do próprio organismo etc.) e pode assumir várias formas (por exemplo, cadeia simples, cadeia dupla, vectores, sondas etc.).

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

Proteínas preferidas para utilização de acordo com a invenção são aquelas de estirpe 2996 ou estirpe 394/98 (uma estirpe Nova Zelândia) de *N. meningitidis* serogrupo B. A não ser que indicado de outra maneira, as proteínas mencionadas no presente documento são da estirpe 2996 de *N.*

meningitidis. Será apreciado, no entanto, que a invenção não é em geral limitada pela estirpe. Referências a uma proteína particular (por exemplo, '287', '953' etc.) podem ser consideradas que incluam proteína de qualquer estirpe.

Proteínas híbridas

Numa abordagem para a expressão heteróloga, proteínas 287 e 953 são expressas como uma única proteína híbrida. É preferido que nenhum parceiro de fusão não de *Neisseria* (por exemplo, GST ou poli-His) seja usado.

Isto oferece duas vantagens. Em primeiro lugar, uma proteína que pode ser instável ou pobremente expressa por si mesma pode ser assistida por meio da adição de um parceiro híbrido adequado que supere o problema. Em segundo lugar, o fabrico comercial é simplificado - somente uma expressão e purificação precisa ser utilizada com a finalidade de produzir duas proteínas separadamente úteis.

As proteínas fusionadas no híbrido podem ser unidas directamente, ou podem ser unidas via um péptido ligante, por exemplo, via um ligante de poli- glicina (isto é, G_n onde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais) ou via uma sequência de péptido curta que facilita a clonagem. É evidentemente preferido não unir uma proteína AG ao terminal C de um ligante de poli-glicina.

As proteínas fusionadas podem não possuir péptidos líder nativos ou podem incluir a sequência de péptido líder do parceiro de fusão N terminal.

O método é bem adequado à expressão de proteínas 287 e 953.

As proteínas 287 e 953 podem ser usadas na sua forma essencialmente de comprimento completo, ou formas de deleções de poli-glicina (ΔG) podem ser usadas (por exemplo, ΔG -287, etc.), ou formas truncadas podem ser usadas (por exemplo, $\Delta 1$ -287, $\Delta 2$ -287 etc.), ou versões de domínio deletado podem ser usadas (por exemplo, 287B, 287C, 287BC, etc.).

287 está preferentemente na extremidade C terminal de um híbrido; se for para ser usado no terminal N, se for preferido usar uma forma AG de 287, é usado (por exemplo, como o terminal N de um híbrido com 953).

287 é preferentemente da estirpe 2996 ou da estirpe 394/98.

Alinhamentos de formas polimórficas de 287 e 953 são revelados no documento W000/66741. Qualquer um destes polimorfos pode ser usado de acordo com a presente invenção.

Hospedeiro heterólogo

Embora a expressão das proteínas da invenção possa ocorrer no hospedeiro nativo (isto é, o organismo em que a proteína é expressa na natureza), a presente invenção utiliza um hospedeiro heterólogo. O hospedeiro heterólogo pode ser procariótico ou eucariótico. É preferentemente *E. coli*, mas outros hospedeiros adequados incluem *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria einerea*, *Mycobacteria* (por exemplo, *M. tuberculosis*), levedura etc.

Vectores etc.

Tal como os métodos descritos anteriormente, a invenção proporciona (a) ácido nucleico e vectores úteis nestes métodos (b) células hospedeiras que contêm os ditos vectores (c) proteínas expressas ou expressáveis pelos métodos (d) composições que compreendem estas proteínas, que podem ser adequadas como vacinas, por exemplo, ou como reagentes de diagnóstico, ou como composições imunogénicas (e) estas composições para utilização como medicamentos (por exemplo, como vacinas) ou como reagentes de diagnóstico (f) a utilização destas composições no fabrico de (1) um medicamento para tratar ou prevenir infecção devido a bactérias do género *Neisseria* (2) um reagente de diagnóstico para detectar a presença de bactérias do género

Neisseria ou de anticorpos produzidos contra bactérias do género *Neisseria*, e/ou (3) um reagente que pode produzir anticorpos contra bactérias do género *Neisseria* e (g) um método de tratamento de um paciente, que compreende administrar ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz destas composições.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra duas proteínas híbridas de acordo com a invenção.

MODOS PARA LEVAR A CABO A INVENÇÃO

Exemplo 1 - proteína 287

A proteína 287 de *N. meningitidis* (serogrupo B, estirpe 2996) tem a seguinte sequência:

↗AG287

```

1  MFERSVIAMA CIFALSACGG GGGGSPDVKS ADTLSPKPAAP VVAEKETEVK
51 EDAPQAGSQG QGAPSTQGSQ DMAAVSAENT GNNGAATTDK PKNEDEGPQN
101 DMPQNSAESA NQTGNNQPAD SSDSAPASNP APANGGSNFG RVDLANGVLI
151 DGPSQNITLT HCKGDSCNGD NLLDEEAPSK SEFENLNESE RIEKYKKDGK
201 SDKFTNLVAT AVQANGTNKY VIIYKDKSAS SSSARFRRSA RSRRSLPAEM
251 PLIPVNQADT LIVDGEAVSL TGHSGNIFAP EGNRYRLTYG AEKLPGGSYA
301 LRVQGEPAKG EMLAGTAVYN GEVLHFHTEN GRPYPTRGRF AAKVDFGSKS
351 VDGIIIDSGDD LHMGTQKFKA AIDGNGFKGT WTENGGGDVS GRFYGPAGEE
401 VAGKYSYRPT DAEKGGFGVF AGKKEQD*
```

O péptido líder é mostrado sublinhado.

As sequências de 287 de outras estirpes podem ser encontradas nas Figuras 5 e 15 do documento WO00/66741.

O Exemplo 9 do documento WO99/57280 revela a expressão de 287 como uma fusão de GST em *E. coli*.

Um número de abordagens adicionais para expressar 287 em *E. coli* foi usado, incluindo:

- 1) 287 como uma fusão de cauda de His ('287-His');
- 2) 287 com o seu próprio péptido líder, mas sem qualquer parceiro de fusão ('287L');
- 3) 287 com o péptido líder ORF4 e sem qualquer parceiro de fusão ('287LORf4'); e
- 4) 287 sem o seu péptido líder e sem qualquer parceiro de fusão ('287^{não etiquetada}');

```

1 CGGGGGGSPD VKSADTLSP AAPVVAEKET EVKEDAPQAG SQGQGAPSTQ
51 GSQDMAAVSA ENTGNNGGAAT TDKPKNEDEG PQNDMPQNSA ESANQTGNNG
101 PADSSDSAPA SNPAPANGGS NFGRVDLANG VLIDGPSQNI TLTHCKGDSC
151 NGDNLLDEEA PSKSEFENLN ESERIEKYKK DGKSDKFTNL VATAVQANGT
201 NKVYIIYKDK SASSSSARFR RSARSRRSLP AEMPLIPVNQ ADTLIVDGEA
251 VSLTGHSGNI FAPEGNYRYL TYGAEKLP GG SYALRVQGEPA AKGEMLAGTA
301 VYNGEVLHFH TENGRPYPTR GRFAAKVDFG SKSVDGIIDS GDDLHMGTOK
351 FKAADGNGF KGTWTENGGG DVSGRFYGPA GEEVAGKYSY RPTDAEKGGF
401 GVFAKGKEQD *

```

Todas estas proteínas poderiam ser expressas e purificadas.

'287L' e '287Lorf4' foram confirmados como lipoproteínas.

Como mostrado na Figura 2, '287Lorf4' foi construído por meio da digestão de 919Lorf4 com NheI e XhoI. O péptido líder inteiro ORF4 foi restaurado pela adição de uma sequência de ADN que codifica os aminoácidos que faltam, como uma cauda, no iniciador de extremidade 5' (287Lorf4 for), fusionada à sequência codificante 287. O gene de 287 que codifica a proteína madura foi amplificado usando os oligonucleótidos 287Lorf4 For e Rev (incluindo os locais NheI e XhoI, respectivamente), digeridos com NheI e XhoI e ligados ao fragmento pETOrf4 purificado.

Exemplo 2 - Δ G287 e híbridos

A proteína que não possui os aminoácidos N terminal até GGGGGG é denominada ' Δ G 287'. Na estirpe MC58, a sua sequência (péptido líder sublinhado) é

↪ Δ G287

```

1 MFKRSVIAMA CIFALSACGG GGGGSPDVKS ADTLSPKPAAP VVSEKETEAK
51 EDAPQAGSQ QGAPSAQGSQ DMAAVSEENT GNGGAVTADN PKNEDEVAQN
101 DMPQNAAGTD SSTPNHTPDP NMLAGNMENQ ATDAGESSQP ANQPDMANAA
151 DGMQGDDPSA GGQNAGNTAA QGANQAGNNQ AAGSSDPIPA SNPAPANGGS
201 NFGRVDLANG VLIDGPSQNI TLTHCKGDSC SGNNFLDEEV QLKSEFEKLS
251 DADKISNYKK DGKNDKFVGL VADSVQMKGI NQYIIFYKPK PTSFARFRS
301 ARSRRSLPAE MPLIPVNQAD TLIVDGEAVS LTGHSGNIFA PEGNYRYLTY
351 GAEKLPGGSY ALRVQGEPAK GEMLAGAAVY NGEVLHFHTE NGRPYPTRGR
401 FAAKVDFGSK SVDGIIDSGD DLHMGTOKFK AAIDGNGFKG TWTENGSGDV
451 SGKFYGPAGE EVAGKYSYRP TDAEKGGFGV FAGKKEQD*

```

Δ G287, com ou sem cauda de His (' Δ G287-His' e ' Δ G287K', respectivamente), são expressas em níveis muito bons em comparação com a '287-His' ou '287^{não etiquetada}'.

As proteínas Δ G287 foram feitas e purificadas para as

estirpes MC58, 1000 e BZ232. Cada uma destas deu titulações elevadas de ELISA e também titulações bactericidas em soro de >8192. Δ G287K, expressa a partir de pET-24b, deu excelentes titulações em ELISA e no ensaio bactericida em soro.

Δ G287 foi também fusionada directamente na grelha a montante de 953, (sequências mostradas a seguir).

AG287-953

```

1  ATGGCTAGCC CCGATGTTAA ATCGGCGGAC ACGCTGTCAA AACC GGCCGC
51  TCCTGTTGTT GCTGAAAAAG AGACAGAGGT AAAAGAAGAT GCGCCACAGG
101 CAGGTTCCTCA AGGACAGGGC GCGCCATCCA CACAAGGCAG CCAAGATATG
151 GCGGCAGTTT CGGCAGAAAA TACAGGCAAT GGCGGTGCGG CAACAACGGA
201 CAAACCCAAA AATGAAGACG AGGGACCGCA AAATGATATG CCGCAAAATT
251 CCGCCGAATC CGCAAATCAA ACAGGGAACA ACCAACCCGC CGATTCTTCA
301 GATTCCGCCC CCGCGTCAAA CCCTGCACCT GCGAATGGCG GTAGCAATTT
351 TGAAGGGTTT GATTTGGCTA ATGGCGTTTT GATTGATGGG CCGTCGCAAA
401 ATATAACGTT GACCCACTGT AAAGGCGATT CTTGTAATGG TGATAATTTA
451 TTGGATGAAG AAGCACCGTC AAAATCAGAA TTTGAAAATT TAAATGAGTC
501 TGAACGAATT GAGAAATATA AGAAAGATGG GAAAAGCGAT AAATTTACTA
551 ATTTGGTTGC GACAGCAGTT CAAGCTAATG GAACTAACAA ATATGTCATC
601 ATTTATAAAG ACAAGTCCGC TTCATCTTCA TCTGCGCGAT TCAGGCGTTC
651 TGCACGGTCG AGGAGGTCGC TTCCTGCCGA GATGCCGCTA ATCCCCGTCA
701 ATCAGGCGGA TACGCTGATT GTCGATGGGG AAGCGGTCAG CCTGACGGGG
751 CATTCCGGCA ATATCTTCGC GCCCGAAGGG AATTACCGGT ATCTGACTTA
801 CGGGGCGGAA AAATTGCCCC GCGGATCGTA TGCCCTCCGT GTGCAAGGCG
851 AACC GGCAAA AGGCGAAATG CTTCGTGGCA CGGCCGTGTA CAACGGCGAA
901 GTGCTGCATT TTCATACGGA AACGGCCGT CCGTACCCGA CTAGAGCCAG
951 GTTTGCCGCA AAAGTCGATT TCGGCAGCAA ATCTGTGGAC GGCATTATCG
1001 ACAGCGGCGA TGATTTGCAT ATGGGTACGC AAAAATTCAA AGCCGCCATC
1051 GATGGAAACG GCTTTAAGGG GACTTGGACG GAAAATGGCG GCGGGGATGT
1101 TTCCGGAAGG TTTTACGGCC CGGCCGGCGA GGAAGTGGCG GGA AAATACA
1151 GCTATCGCCC GACAGATGCG GAAAAGGGCG GATTCGGCGT GTTTGCCGGC
1201 AAAAAAGAGC AGGATGGATC CGGAGGAGGA GGAGCCACCT ACAAAGTGGA
1251 CGAATATCAC GCCAACGCCC GTTTCGCCAT CGACCATTTC AACACCAGCA
1301 CCAACGTCGG CGGT'TTTTAC GGTCTGACCG GTTCCGTCGA GTTCGACCAA
1351 GCAAAACGCG ACGGTAAAT CGACATCACC ATCCCCGTTG CCAACCTGCA
1401 AAGCGGTTCT CAACACTTTA CCGACCACCT GAAATCAGCC GACATCTTCG
1451 ATGCCGCCCC ATATCCGGAC ATCCGCTTTG TTTCCACCAA ATTCAACTTC
1501 AACGGCAAAA AACTGGTTTC CGTTGACGGC AACCTGACCA TGCACGGCAA
1551 AACC GCGCCC GTCAA ACTCA AAGCCGAAAA ATTCAACTGC TACCAAAGCC
1601 CGATGGCGAA AACC GAAGTT TGCGGCGGCG ACTTCAGCAC CACCATCGAC
1651 CGCACCAAAT GGGGCGTGGA CTACCTCGTT AACGTTGGTA TGACCAAAG
1701 CGTCCGCATC GACATCCAAA TCGAGGCAGC CAAACAATAA CTCGAG

1  MASPDVKSAD TLSKPAAPVV AEKETE VKED APQAGSQGQG APSTQGSQDM
51  AAVSAENTGN GGAATTDKPK NEDEGPQNDM PQNSAESANQ TGNNQPADSS
101 DSAPASNPAP ANGGSNFGRV DLANGVLIDG PSQNLTLTHC KGDSCNGDNL
151 LDEEAPSKSE FENL NESERI EKYKKDGKSD KFTNLVATAV QANGTNKYVI
201 IYKDKSASSS SARFRSARS RRS LPAEMPL IPVNQADTLI VDGEAVSLTG
251 HSGNIFAPEG NYRYLTYGAE KLP GGSYALR VQGEPAKGEM LAGTAVYNGE
301 VLHFHTENGR PYPTRGRFAA KVD FGSKSVD GIIDSGDDLH MGTQKFKAAI
351 DGNGFKGTWT ENGGGDVSGR FYGPAGEEVA GKYSYRPTDA EKG GFGVFAG
401 KKEQDGSGGG GATYKVDEYH ANARFAIDHF NTSTNVGGFY GLTGSVEFDQ
451 AKRDGKIDIT IPVANLQSGS QHFTDHLKSA DIFDAAQYPD IRFVSTKFNF
501 NGKKLVSVDG NLTMHGKTAP VKLKA EKFN YQSPMAKTEV CGGDFSTTID
551 RTKWGV DYL NVGMTKSVRI DIQIEAAKQ*

```

	ELISA	Bactericida
AG287-953-His	3834	65536

As proteínas híbridas com AG287 no terminal N são

portanto imunologicamente superiores às misturas simples.

As mesmas proteínas híbridas foram feitas usando a estirpe de Nova Zelândia 394/98 ao invés de 2996:

AG287NZ-953

```

1  ATGGCTAGCC CCGATGTCAA GTCGGCGGAC ACGCTGTCAA AACCTGCCGC
51  CCCTGTTGTT TCTGAAAAAG AGACAGAGGC AAAGGAAGAT GCGCCACAGG
101 CAGGTTCTCA AGGACAGGGC GCGCCATCCG CACAAGGCGG TCAAGATATG
151 GCGGCGGTTT CGGAAGAAAA TACAGGCAAT GGCGGTGCGG CAGCAACGGA
201 CAAACCCAAA AATGAAGACG AGGGGGCGCA AAATGATATG CCGCAAAATG
251 CCGCCGATAC AGATAGTTTG ACACCGAATC ACACCCCGGC TTCGAATATG
301 CCGGCCGGAA ATATGGAAAA CCAAGCACCG GATGCCGGGG AATCGGAGCA
351 GCCGGCAAAC CAACCGGATA TGGCAAATAC GGCGGACGGA ATGCAGGGTG
401 ACGATCCGTC GGCAGGCGGG GAAAATGCCG GCAATACGGC TGCCCAAGGT
451 ACAAATCAAG CCGAAAACAA TCAAACCGCC GGTTCTCAAA ATCCTGCCTC
501 TTCAACCAAT CCTAGCGCCA CGAATAGCGG TGGTGATTTT GGAAGACGCA
551 ACGTGGGCAA TTCTGTTGTG ATTGACGGGC CGTCGCAAAA TATAACGTTG
601 ACCCACTGTA AAGGCGATTG TTGTAGTGGC AATAATTTCT TGGATGAAGA
651 AGTACAGCTA AAATCAGAAT TTGAAAAATT AAGTGATGCA GACAAAATAA
701 GTAATTACAA GAAAGATGGG AAGAATGACG GGAAGAATGA TAAATTTGTC
751 GGTTTGTTG CCGATAGTGT GCAGATGAAG GGAATCAATC AATATATTAT
801 CTTTTATAAA CCTAAACCCA CTTCAATTTG GCGATTTAGG CGTTCTGCAC
851 GGTGAGGCG GTGCTTCCG GCCGAGATGC CGCTGATTCC CGTCAATCAG
901 GCGGATACGC TGATTGTCGA TGGGGAAGCG GTCAGCCTGA CGGGGCATTC
951 CGGCAATATC TTCGCGCCCG AAGGGAATTA CCGGTATCTG ACTTACGGGG
1001 CGGAAAAATT GCCCGGCGGA TCGTATGCCC TCCGTGTTCA AGGCGAACCT
1051 TCAAAGGCG AAATGCTCGC GGGCACGGCA GTGTACAACG GCGAAGTGCT
1101 GCATTTTCAT ACGGAAAACG GCCGTCCGTC CCCGTCCAGA GGCAGGTTTG
1151 CCGCAAAAGT CGATTTCGGC AGCAAATCTG TGGACGGCAT TATCGACAGC
1201 GGCGATGGTT TGCATATGGG TAGCAAAAAA TTCAAAGCCG CCATCGATGG
1251 AAACGGCTTT AAGGGGACTT GGACGGAAAA TGGCGGCGGG GATGTTTCCG
1301 GAAAGTTTTA CGGCCC GGCGAGGAAG TGGCGGGAAA ATACAGCTAT
1351 CGCCCAACAG ATGCGGAAAA GGGCGGATTC GGCGTGTTTG CCGGCAAAAA
1401 AGAGCAGGAT GGATCCGGAG GAGGAGGAGC CACCTACAAA GTGGACGAAT
1451 ATCAGCCCAA CGCCCGTTTC GCCATCGACC ATTTCAACAC CAGCACCAAC
1501 GTCGGCGGTT TTTACGGTCT GACCGGTTCC GTCGAGTTCC ACCAAGCAAA
1551 ACGCGACGGT AAAATCGACA TCACCATCCC CGTTGCCAAC CTGCAAAGCG
1601 GTTCGCAACA CTTTACCGAC CACCTGAAAT CAGCCGACAT CTTCGATGCC
1651 GCCCAATATC CGGACATCCG CTTTGTTTCC ACCAAATTCA ACTTCAACGG
1701 CAAAAAATG GTTTCCGTTG ACGGCAACCT GACCATGCAC GGCAAAACCG
1751 CCCCCGTCAA ACTCAAAGCC GAAAAATTCA ACTGCTACCA AAGCCCGATG
1801 GCGAAAACCG AAGTTTGCGG CGGCGACTTC AGCACCACCA TCGACCGCAC
1851 CAAATGGGGC GTGGACTACC TCGTTAACGT TGGTATGACC AAAAGCGTCC
1901 GCATCGACAT CCAAATCGAG GCAGCCAAAC AATAAAAGCT T

```

```

1  MASPDVKSAD TLSKPAAPVV SEKETEAKED APQAGSQGQG APSAQGGQDM
51  AAVSEENTGN GGAAATDKPK NEDEGAQNDM PQNAADTDSL TPNHTPASNM
101 PAGNMENQAP DAGESEQPAN QPDMANTADG MQGDDPSAGG ENAGNTAAQG
151 TNQAENNQTA GSQNPASSTN PSATNSGGDF GRTNVGNSVV IDGPSQNIL
201 THCKGDSCSG NNFLDEEVQL KSEFEKLSDA DKISNYKKDG KNDGKNDKVF
251 GLVADSVQMK GINQYIIFYK PKPTS FARFR RSARSRSLP AEMPLIPVNQ
301 ADTLIVDGEA VSLTGHSGNI FAPEGNYRYL TYGAEKLP GG SYALRVQGEF
351 SKGEMLAGTA VYNGEVLHFH TENGRPSPSR GRFAAKVDFG SKSVDGIIDS
401 GDGLHMGTOK FKAIDGNF KGTWTENGGG DVSGKFYGPA GEEVAGKYSY

```

```

451 RPTDAEKGGF GVFAGKKEQD GSGGGGATYK VDEYHANARF AIDHFNTSTN
501 VGGFYGLTGS VEFDQAKRDG KIDITIPVAN LQSGSQHFDT HLKSADIFDA
551 AQYPDIRFVS TKFNFNGKKL VSV DGNLTMH GKTAPVKLKA EKFN CYQSPM
601 AKTEVCGGDF STTIDRTKWG VDYLNVGMT KSVRIDIQIE AAKQ*

```

Exemplo 3 - fusões C terminal ('híbridos') com 287M/ Δ G287

De acordo com a invenção, híbridos de duas proteínas A & B podem ser $\text{NH}_2\text{-A-B-COOH}$ ou $\text{NH}_2\text{-B-A-COOH}$. O efeito desta diferença foi investigado usando proteína 287 terminal C (na forma '287-His') ou terminal N (na forma Δ G287 - sequências mostradas acima) a 953. Um painel de estirpes foi usado, incluindo estirpe homóloga 2996. FCA foi usado como adjuvante:

	287 & 953	
Estirpe	AG287-953	953-287
2996	65536	8192
BZ232	128	<4
1000	<4	<4
MC58	16384	1024
NGH38	>2048	4096
394/98	256	128
MenA (F6124)	>2048	32
MenC (BZ133)	>8192	<16

Melhores titulações bactericidas são geralmente vistas com 287 no terminal N (na forma Δ G)

Exemplo 4 - fusões N terminal ('híbridos') a 287

A expressão de proteína 287 como comprimento completo com uma cauda de His C terminal, ou sem o seu péptido líder, mas com uma cauda de His C terminal, dá níveis de expressão francamente baixos. A melhor expressão é alcançada usando uma fusão de GST N terminal.

Como uma alternativa à utilização de GST como um parceiro de fusão N terminal, 287 foi colocado no terminal C de proteína 953 ('953-287'). Em ambos os casos, os péptidos líder foram deletados, e os híbridos eram fusões *in-frame* (na mesma grelha de leitura) directas.

Para gerar o híbrido 953-287, os péptidos líder das

duas proteínas foram omitidos desenhando-se o iniciador directo a jusante do líder de cada sequência; a sequência do codão de terminação foi omitida no iniciador reverso 953, mas incluída no iniciador reverso 287. Para o gene de 953, os iniciadores 5' e 3' usados para a amplificação incluíam um local de restrição NdeI e um local de restrição BamHI respectivamente, ao passo que para a amplificação do gene de 287 os iniciadores 5' e 3' incluíam um local de restrição BamHI e local de restrição aXhoI respectivamente. Nesse sentido, uma clonagem direccionada sequencial dos dois genes em pET21b+, usando NdeI-BamHI (para clonar o primeiro gene) e subsequentemente BamHI-XhoI (para clonar o segundo gene) poderia ser alcançada.

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

	Mistura com 287	Híbrido com 287
953	8192	8192

Dados para a actividade bactericida contra estirpes heterólogas MenB e contra serotipos A e C foram também obtidos para 953-287:

	953	
<i>Estirpe</i>	<i>Mistura</i>	<i>Híbrido</i>
MC58	512	1024
NGH38	2048	4096
BZ232	1024	16
MenA (F6124)	2048	32
MenC (C11)	>2048	n.d.
MenC (BZ133)	>4096	<16

DETALHES EXPERIMENTAIS

Purificação de proteína FPLC

O seguinte quadro sumariza a purificação de proteína FPLC que foi usada:

Proteína	PI	Coluna	Tampão	pH	Protocolo
953-287	4,92	Mono Q	Bis-Tris propano	6,2	A

As soluções de tampão incluíam 20-120 mM de NaCl, 5,0 mg/ml de CHAPS e 10 % v/v de glicerol. O dialisado foi centrifugado a 13000g durante 20 min e aplicado a uma resina de permuta iónica mono Q ou mono S FPLC. Tampão e resinas de permuta iónica foram escolhidos de acordo com o pI da proteína de interesse e as recomendações do manual de protocolo de FPLC [Pharmacia: FPLC Ion Exchange and Chromatofocussing; Principles and Methods. Pharmacia Publication]. As proteínas foram eluídas usando um gradiente etapa por etapa de NaCl. A purificação foi analisada por SDS-PAGE e a concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford.

A letra na coluna 'protocolo' refere-se ao seguinte:

FPLC-A: 953-287 foi purificada a partir da fracção solúvel de *E. coli* obtida após quebra das células. Colónias individuais que abrigavam o plasmídeo de interesse foram crescidas durante a noite a 37 °C em 20 ml de cultura líquida de LB/Amp (100 mg/ml). As bactérias foram diluídas 1:30 em 1,0 L de meio fresco e crescidas a 30 °C ou 37 °C até a OD₅₅₀ atingir 0,6-08. A expressão de proteína recombinante foi induzida com IPTG a uma concentração final de 1,0 mM. Após a incubação durante 3 horas, as bactérias foram colhidas por centrifugação a 8000g durante 15 minutos a 4 °C. Quando necessário as células eram armazenadas a -20 °C. Todos os procedimentos subsequentes foram realizados em gelo ou a 4 °C. As células foram lisadas por meio de sonicação usando um Branson Sonifier 450. As células quebradas foram centrifugadas a 8000g durante 30 min para sedimentar as células não quebradas e corpos de inclusão e o sobrenadante levado a 35 % v/v de saturação pela adição de 3,9 M (NH₄)₂SO₄. O precipitado foi sedimentado a 8000g durante 30 minutos. O sobrenadante foi levado a 70 % v/v de

saturação pela adição de 3,9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o precipitado colhido como anteriormente. Os peletes que contêm a proteína de interesse foram identificados por SDS-PAGE e dialisados contra o tampão de permuta iónica apropriado (veja-se a seguir) durante 6 horas ou durante a noite. A fracção periplasmática de *E. coli* que expressa 953L foi preparada de acordo com o protocolo de Evans *et al.* [Infert. Immun. (1974) 10:1010-1017] e dialisada contra o tampão de permuta iónica apropriado. O tampão e resina de permuta iónica foram escolhidos de acordo com o pI da proteína de interesse e as recomendações do manual de protocolo de FPLC (Pharmacia). As soluções de tampão incluíam 20 mM de NaCl, e 10 % (v/v) de glicerol. O dialisado foi centrifugado a 13000g durante 20 min e aplicado a uma resina de permuta iónica mono Q ou mono S FPLC. O tampão e resina de permuta iónica foram escolhidos de acordo com o pI da proteína de interesse e as recomendações do manual de protocolo de FPLC (Pharmacia). As proteínas foram eluídas a partir da resina de permuta iónica usando gradientes etapa por etapa ou contínuos de NaCl. A purificação foi analisada por SDS-PAGE e a concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford. A clivagem do péptido líder de proteínas periplasmáticas foi demonstrada por meio da sequenciação do terminal NH_2 (veja-se a seguir).

Estratégia de clonagem e projecto de oligonucleótido

Os genes que codificam antigénios de interesse foram amplificados por PCR, usando oligonucleótidos projectados com base na sequência genómica de B MC58 de *N. meningitidis*. ADN genómico da estirpe 2996 tem sido sempre usado como um molde em reacções de PCR, a não ser que de outro modo especificado, e os fragmentos amplificados foram clonados no vector de expressão pET21b+ (Novagen) para expressar a proteína como produto com cauda de His C terminal, ou em pET-24b+ (Novagen) para expressar a

proteína na forma 'não etiquetada' (por exemplo, ΔG 287K).

Onde uma proteína foi expressa sem um parceiro de fusão e com o seu próprio péptido líder (se estiver presente), a amplificação da grelha de leitura aberta (ATG a codões STOP) foi realizada.

Onde uma proteína foi expressa na forma 'não etiquetada', o péptido líder foi omitido por meio do projecto do iniciador de amplificação de extremidade 5' a jusante da sequência líder predita.

A temperatura de fusão dos iniciadores usados em PCR dependeu do número e tipo de nucleótidos de hibridação no iniciador completo, e foi determinado usando as fórmulas:

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

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

As temperaturas de fusão dos oligonucleótidos seleccionados foram usualmente 65-70 °C para o oligo completo e 50-60 °C para a região de hibridação em separado.

Oligonucleótidos foram sintetizados usando um Sintetizador de ADN/ARN Perkin Elmer 394, eluídos das colunas em 2,0 ml de NH_4OH , e desprotegidos por incubação durante 5 horas a 56 °C. Os oligos foram precipitados por meio da adição de 0,3M de Acetato de sódio e 2 volumes de etanol. As amostras foram centrifugadas e os peletes ressuspensos em água.

		Sequências	Local de restrição
287	Fwd	CTAGCTAGC-GGGGGCGGCGGTGGCG	NheI
	Rev	CCCGCTCGAG-TCAATCCTGCTCTTTTTTGCC	XhoI
953L	Fwd	GGGAATTCCATATG-AAAAAAATCATCTTCGCCG	NdeI

(continuação)

		Sequências	Local de restrição
	Rev	CCCGCTCGAG- TTATTGTTTGGCTGCCTCGAT	XhoI
953- fu	Fwd	GCCACCTACAAAGTGGACG- GCCACCTACAAAGTGGACG	NdeI
	Rev	CGGGGATCC- TTGTTTGGCTGCCTCGATTG	BamHI
NB - Todas as reacções de PCR usam a estirpe 2996 a não ser que de outro modo especificado (por exemplo, estirpe MC58)			

Em todas as construções que começam com um ATG não seguido por um único local NheI, o codão ATG é parte do local NdeI usado para a clonagem. As construções feitas usando NheI como um local de clonagem na extremidade 5' (por exemplo, todas àquelas que contêm 287 no terminal N) têm dois codões adicionais (GCT AGC) fusionados à sequência codificante do antigénio.

Preparação de modelos de ADN cromossómico

As estirpes 2996, MC58, 394.98, 1000 e BZ232 (e outras) de *N. meningitidis* foram crescidas à fase exponencial em 100 ml de meio GC, colhidas por centrifugação, e ressuspensas em 5 ml de tampão (20 % p/v de sacarose, 50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, pH8). Após 10 minutos de incubação em gelo, as bactérias foram lisadas por meio da adição de 10 ml de solução de lise (50 mM de NaCl, 1 % de Sarcosilo de sódio, 50 mg/ml de Proteinase K), e a suspensão incubada a 37 °C durante 2 horas. Duas extracções de fenol (equilibradas até pH 8) e uma extracção com CHCl₃/isoamilálcool (24:1) foram realizadas. O ADN foi precipitado por meio da adição de 0,3M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol, e colhido por centrifugação. O pelete foi lavado uma vez com 70 % (v/v) de etanol e redissolvido em 4,0 ml de tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1

mM de EDTA, pH 8,0). A concentração de ADN foi medida pela leitura de OD₂₆₀.

Amplificação de PCR

O protocolo de PCR padrão foi como se segue: 200 ng de ADN genómico das estirpes 2996, MC58 1000, ou BZ232 ou 10 ng de preparação de ADN plasmídico de clones recombinantes foram usados como molde na presença de 40 mM de cada iniciador de oligonucleótido, 400-800 mM de solução de dNTPs, 1x tampão de PCR (incluindo 1,5 mM de MgCl₂), 2,5 unidades de polimerase de ADN TaqI (usando o Modelo Perkin-Elmer AmpliTaq, Boehringer Mannheim Expand™ Long).

Após uma incubação preliminar de 3 minutos da mistura completa a 95 °C, cada amostra passou por uma amplificação de duas etapas: os primeiros 5 ciclos foram realizados usando a temperatura de hibridação que excluiu a cauda de enzima de restrição do iniciador (T_{m1}). Isto foi seguido por 30 ciclos de acordo com a temperatura de hibridação calculada para os oligos de comprimento inteiro (T_{m2}). Tempos de alongamento, realizados a 68 °C ou 72 °C, variaram de acordo com o comprimento da Orf a ser amplificada. No caso da Orf1, o tempo de alongamento, que começa desde 3 minutos, foi aumentado em 15 segundos cada ciclo. Os ciclos foram completados com uma etapa de extensão de 10 minutos a 72 °C.

O ADN amplificado foi carregado directamente num gel de agarose a 1 %. O fragmento de ADN correspondente à banda de tamanho correcto foi purificado do gel usando o Kit de Extracção em Gel de Qiagen, seguindo o protocolo do fabricante.

Digestão de fragmentos de PCR e dos vectores de clonagem

O ADN purificado correspondente ao fragmento amplificado foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas para a clonagem em pET-21b+, pET22b+ ou pET-24b+. Os fragmentos digeridos foram purificados usando o kit de purificação QIAquickPCR (seguindo as instruções do

fabricante) e eluídos com H₂O ou 10 mM de Tris, pH 8,5. Os vectores de plasmídeo foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas, carregadas num gel de agarose a 1,0 % e a banda correspondente ao vector digerido purificada usando o Kit de Extracção em Gel Qiagen QIAquick.

Clonagem

Os fragmentos correspondentes a cada gene, anteriormente digeridos e purificados, foram ligados em pET21b+, pET22b+ ou pET-24b+. Uma razão molar de 3:1 fragmento/vector foi usada com ligase de ADN T4 no tampão de ligação fornecido pelo fabricante.

O plasmídeo recombinante foi transformado em DH5 competente de *E. coli* ou HB101 por meio da incubação da solução de reacção de ligase e bactérias durante 40 minutos em gelo, então a 37 °C durante 3 minutos. Isto foi seguido pela adição de 800 µl de caldo LB e incubação a 37 °C durante 20 minutos. As células foram centrifugadas a velocidade máxima num micrófugo Eppendorf, ressuspensas em aproximadamente 200 µl do sobrenadante e colocadas em placa em agar com ampicilina e LB (100 mg/ml).

O rastreio para clones recombinantes foi realizado por meio do crescimento de colónias aleatoriamente seleccionadas durante a noite a 37 °C em 4,0 ml de caldo LB + 100 mg/ml ampicilina. As células foram agrupadas em peletes e o ADN de plasmídeo extraído usando o Kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep, seguindo as instruções do fabricante. Aproximadamente 1 mg de cada miniprep individual foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas e o digerido foi carregado num gel de agarose a 1-1,5 % (dependendo do tamanho de inserção esperada), em paralelo com o marcador de peso molecular (1 kb ADN Ladder, GIBCO). Os clones positivos foram seleccionados com base no tamanho da inserção.

Expressão

Após a clonagem de cada gene no vector de expressão,

os plasmídeos recombinantes foram transformados em estirpes de *E. coli* adequadas para a expressão da proteína recombinante. 1 ml de cada construção foi usado para transformar BL21-DE3 de *E. coli* como foi descrito anteriormente. As colónias recombinantes individuais foram inoculadas em 2 ml LB+Amp (100 mg/ml), incubadas a 37 °C durante a noite, então diluídas 1:30 em 20 ml de LB+Amp (100 mg/ml) em balões de 100 ml, para dar um OD₆₀₀ entre 0,1 e 0,2. Os balões foram incubados a 30 °C ou a 37 °C num agitador de banho de água giratório até que a OD₆₀₀ indicasse crescimento exponencial adequado para a indução de expressão (0,4-0,8 OD). A expressão de proteínas foi induzida por meio da adição de 1,0 mM de IPTG. Após 3 horas de incubação a 30 °C ou 37 °C a OD₆₀₀ foi medida e a expressão examinada. 1,0 ml de cada amostra foi centrifugado num micrófugo, o pelete ressuspense em PBS e analisado por SDS-PAGE e coloração com Coomassie Blue.

Clonagem Gateway e expressão

As sequências marcadas GATE foram clonadas e expressas usando a Tecnologia de Clonagem GATEWAY (GIBCO- BRL). A clonagem recombinacional (RC) baseia-se nas reacções de recombinação que medeiam a integração e excisão de fago em e a partir do genoma de *E. coli*, respectivamente. A integração envolve a recombinação do local attP do ADN de fago dentro do local attB localizado no genoma bacteriano (reacção de BP) e gera um genoma de fago integrado flanqueado por locais attL e attR. A excisão recombina locais attL e attR de volta a locais attP e attB (reacção de LR). A reacção de integração requer duas enzimas [a Integrase de proteína de fago (Int) e o factor de hospedeiro de integração de proteína bacteriana (IHF)] (clonase de BP). A reacção de excisão requer Int, IHF, e uma enzima de fago adicional, Excisionase (Xis) (LR clonase). Derivados artificiais do local de recombinação bacteriana de 25 pb attB, denominado como B1 e B2, foram

adicionados à extremidade 5' dos iniciadores usados nas reacções de PCR para amplificar as ORFs de *Neisseria*. Os produtos resultantes foram BP clonados num "Vector dador" que contém derivados complementares do local de recombinação de fago attP (P1 e P2) usando clonase de BP. Os "Clones de entrada" resultantes contêm ORFs flanqueadas por derivados do local attL (L1 e L2) e foram subclonados em "vectores de destino" de expressão que contêm derivados dos locais attR compatíveis com attL (R1 e R2) usando clonase de LR. Isto teve como resultado "clones de expressão" em que as ORFs são flanqueadas por B1 e B2 e fusionadas na grelha ao GST ou as caudas de His N terminal.

A estirpe de *E. coli* usada para a expressão GATEWAY é BL21-SI. As células desta estirpe são induzidas para a expressão da polimerase de T7 ARN por meio do crescimento em meio que contém sal (0,3 M de NaCl).

Nota-se que este sistema dá caudas de His N terminal.

Preparação de proteínas de membrana.

As fracções compostas principalmente de membrana interna, externa ou total foram isoladas com a finalidade de obter proteínas recombinantes expressas com sequências líder de localização de membrana. O método para a preparação de fracções de membrana, enriquecidas para proteínas recombinantes, foi adaptado de Filip *et al.* [J. Bact. (1973) 115:717-722] e Davies *et al.* [J. Immunol. Met. (1990) 143:215-225]. As colónias individuais que abrigavam o plasmídeo de interesse foram crescidas durante a noite a 37 °C em 20 ml de LB/Amp (100 mg/ml) cultura líquida. As bactérias foram diluídas 1:30 em 1,0 L de meio fresco e crescidas a 30 °C ou 37 °C até a OD₅₅₀ atingir 0,6-0,8. A expressão de proteína recombinante foi induzida com IPTG a uma concentração final de 1,0 mM. Após a incubação durante 3 horas, as bactérias foram colhidas por centrifugação a 8000 g durante 15 minutos a 4 °C e ressuspensas em 20 ml de 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e inibidores de protease

completa (Boehringer-Mannheim). Todos os procedimentos subsequentes foram realizados a 4 °C ou em gelo.

As células foram quebradas por sonicação usando um Sonificador Branson 450 e centrifugadas a 5000 g durante 20 min para sedimentar as células não quebradas e corpos de inclusão. O sobrenadante, que contém membranas e detritos celulares, foi centrifugado a 50000 g (Beckman Ti50, 29000 rpm) durante 75 min, lavado com 20 mM de Bis-tris propano (pH 6,5), 1,0 M de NaCl, 10 % (v/v) de glicerol e sedimentado de novo a 50000 g durante 75 minutos. O pelete foi ressuspenso em 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 2,0 % (v/v) Sarcosilo, inibidor de protease completa (1,0 mM de EDTA, concentração final) e incubado durante 20 minutos para dissolver a membrana interna. Os detritos celulares foram agrupados em peletes por centrifugação a 5000 g durante 10 min e o sobrenadante centrifugado a 75000 g durante 75 minutos (Beckman Ti50, 33000 rpm). As vesículas de membrana externa obtidas a partir do pelete de 75000 g foram lavadas com 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e centrifugadas a 75000 g durante 75 minutos ou durante a noite. A OMV foi finalmente ressuspenso em 500 ml de 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 % v/v de glicerol. Orf1 L e Orf40L foram ambas localizadas e enriquecidas na fracção de membrana externa que foi usada para imunizar ratinhos. A concentração de proteínas foi estimada por Ensaio de Bradford padrão (Bio-Rad), enquanto a concentração de proteínas de fracção de membrana interna foi determinada com o ensaio de proteína DC (Bio-Rad). Várias fracções do procedimento de isolamento foram analisadas por SDS-PAGE.

Purificação de proteínas com cauda de His

Várias formas de 287 foram clonadas das estirpes 2996 e MC58. Foram construídas com uma fusão com cauda de His C terminal e incluídas 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 de His, uma única colónia foi esgotada e crescida durante a noite a 37 °C numa placa de agar LB/Amp (100 µg/ml). Uma colónia isolada desta placa foi inoculada em 20 ml de meio líquido LB/Amp (100 µg/ml) e crescida durante a noite a 37 °C com agitação. A cultura de uma noite foi diluída 1:30 em 1,0 L de meio líquido LB/Amp (100 mg/ml) e deixada que crescesse a temperatura óptima (30 ou 37 °C) até a OD₅₅₀ atingir 0,6-0,8. A expressão de proteína recombinante foi induzida por meio da adição de IPTG (concentração final 1,0 mM) e a cultura incubada durante umas 3 horas adicionais. As bactérias foram colhidas por centrifugação a 8000 g durante 15 min a 4 °C. O pelete bacteriano foi ressuspenso em 7,5 ml de (i) tampão frio A (300 mM de NaCl, 50 mM de tampão fosfato, 10 mM de imidazol, pH 8,0) para proteínas solúveis ou (ii) tampão B (10 mM de Tris-HCl, 100 mM de tampão fosfato, pH 8,8 e, opcionalmente, 8M ureia) para proteínas insolúveis. Os sobrenadantes foram misturados com 150 µl de Ni²⁺-resina (anteriormente equilibrados com tampão A ou tampão B, conforme apropriado) e incubados a temperatura ambiente com agitação suave durante 30 min. A resina foi Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia), preparada de acordo com o protocolo do fabricante. A preparação descontínua foi centrifugada a 700 g durante 5 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. A resina foi lavada duas vezes (descontinuamente) com 10 ml de tampão A ou B durante 10 min, ressuspensa em 1,0 ml de tampão A ou B e carregada numa coluna descartável. A resina continuou a ser lavada com (i) tampão A a 4 °C ou (ii) tampão B a temperatura ambiente, até a OD₂₈₀ do fluxo passante atingir 0,02-0,01. A resina foi lavada adicionalmente com (i) tampão frio C (300 mM de NaCl, 50 mM de tampão fosfato, 20 mM de imidazol, pH 8,0) ou (ii) tampão D (10 mM de Tris-HCl, 100 mM de tampão fosfato, pH 6,3 e, opcionalmente, 8M de ureia) até OD₂₈₀ do fluxo passante atingir 0,02-0,01. A proteína de fusão de

His foi eluída por meio da adição de 700 ml de (i) tampão de eluição frio A (300 mM de NaCl, 50 mM de tampão fosfato, 250 mM de imidazol, pH 8,0) ou (ii) tampão de eluição B (10 mM de Tris-HCl, 100 mM de tampão fosfato, pH 4,5 e, opcionalmente, 8M de ureia) e fracções colhidas até a OD₂₈₀ indicar que toda a proteína recombinante foi obtida. 20 ml de alíquotas de cada fracção de eluição foram analisados por SDS-PAGE. As concentrações de proteína foram estimadas usando o ensaio de Bradford.

Análise de sequência de aminoácidos.

A análise de sequência automatizada do terminal NH₂ de proteínas foi realizada num sequenciador de Beckman (LF 3000) equipado com um analisador de aminoácido feniltiohidantoína em linha (Sistema Gold) de acordo com as recomendações do fabricante.

Imunização

Ratinhos Balb/C foram imunizados com antigénios nos dias 0, 21 e 35 e os soros analisados no dia 49.

Análise de soros - ELISA

O MenB M7 não encapsulado e as estirpes encapsuladas foram cultivados em placas de agar chocolate e incubados durante a noite a 37 °C com 5 % de CO₂. As colónias bacterianas foram colhidas das placas de agar usando uma zaragatoa dracon estéril e inoculadas em Caldo Mueller-Hinton (Difco) que contém 0,25 % de glucose. O crescimento bacteriano foi monitorizado a cada 30 minutos pela OD₆₂₀ seguinte. As bactérias foram deixadas para que crescessem até a OD ter atingido o valor de 0,4-0,5. A cultura foi centrifugada durante 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em PBS que contém 0,025 % formaldeído, e incubadas durante 1 hora a 37 °C e então durante a noite a 4 °C com agitação. 100 µl de células bacterianas foram adicionados a cada poço de uma placa 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). 200 µl 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. 200 µl de soros diluídos (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. 100 µl de soro anti-ratinho de coelho conjugado com HRP (Dako) diluídos 1:2000 em tampão de diluição 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. 100 µl de tampão de substrato para HRP (25 ml de tampão citrato pH 5, 10 mg de O-fenildiamina e 10 µl de H₂O₂) foram adicionados a cada poço e as placas foram deixadas a temperatura ambiente durante 20 minutos. 100 µl de H₂SO₄ a 12,5 % foram adicionados a cada poço e OD₄₉₀ foi seguida. As titulações de ELISA foram calculadas arbitrariamente como a diluição de soros que deu um valor de OD₄₉₀ de 0,4 acima do nível de soros pré-ímmes. A ELISA foi considerada positiva quando a diluição de soros com OD₄₉₀ de 0,4 foi mais alta que 1:400. Análise de soros - Ensaio de ligação de bactérias por Exame de FA CS

A estirpe encapsulada MenB M7 foi cultivada em placa em placas de agar chocolate e incubada durante a noite a 37 °C com 5 % de CO₂. As colónias bacterianas foram colhidas das placas de agar usando uma zaragatoa dracon estéril e inoculadas em 4 tubos que contêm 8 ml cada de Caldo Mueller-Hinton (Difco) que contém 0,25 % de glicose. O crescimento bacteriano foi monitorizado a cada 30 minutos pela OD₆₂₀ seguinte. As bactérias foram deixadas que crescessem até a OD ter atingido o valor de 0,35-0,5. A cultura foi centrifugada durante 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi ressuspensado em

tampão de bloqueio (1 % de BSA em PBS, 0,4 % de NaN_3) e centrifugado durante 5 minutos a 4000 rpm. As células foram ressuspensas em tampão de bloqueio para atingir a OD_{620} de 0,05. 100 ml de células bacterianas foram adicionados a cada poço de um Costar 96 poço placa. 100 μl de soros diluídos (1:100, 1:200, 1:400) (em tampão de bloqueio) foram adicionados a cada poço e as placas incubadas durante 2 horas a 4 °C. As células foram centrifugadas durante 5 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante aspirado e as células lavadas por meio da adição de 200 μl /poço de tampão de bloqueio em cada poço. 100 μl de anti-ratinho de cabra F(ab)_2 conjugado com R-Ficoeritrina, diluídos 1:100, foram adicionados a cada poço e as placas incubadas durante 1 hora a 4 °C. As células foram centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos e lavadas por meio da adição de 200 μl /poço de tampão de bloqueio. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 200 μl /poço de PBS, 0,25 % de formaldeído. As amostras foram transferidas a tubos de FACScan e lidas. A condição para FACScan (Laser Power 15 mW) os ajustes foram: FL2 ligado; FSC-H limite:92; FSC PMT Voltagem: E 01; SSC PMT: 474; Ganhos de Amp. 6,1; FL-2 PMT: 586; valores de compensação: 0.

Análise de soros - ensaio bactericida

A estirpe 2996 de *N. meningitidis* foi crescida durante a noite a 37 °C em placas de agar chocolate (partindo de um stock congelado) com 5 % de CO_2 . As colónias foram colhidas e usadas para inocular 7 ml de caldo Mueller-Hinton, que contém 0,25 % de glicose para atingir uma OD_{620} de 0,05-0,08. A cultura foi incubada durante aproximadamente 1,5 horas a 37 graus com agitação até a OD_{620} atingir o valor de 0,23-0,24. As bactérias foram diluídas em 50 mM de tampão fosfato pH 7,2 que contém 10 mM de MgCl_2 , 10 mM de CaCl_2 e 0,5 % (p/v) de BSA (tampão de ensaio) na diluição de trabalho de 10^5 CFU/ml. O volume total da mistura de reacção final foi 50 μl com 25 μl de diluição seriada de

duas vezes de soro de teste, 12,5 µl de bactérias na diluição de trabalho, 12,5 µl de complemento de filhote de coelho (concentração final 25 %).

Os controlos 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 filhote de coelho, 10 µl dos controlos foram cultivados em placas de agar Mueller-Hinton usando o método de inclinação (tempo 0). A placa de 96 poços foi incubada durante 1 hora a 37 °C com rotação. 7 µl de cada amostra foram cultivados em placas de agar Mueller-Hinton como manchas, ao passo que 101 µl dos controlos foram cultivados em placas de agar Mueller-Hinton usando o método de inclinação (tempo 1). As placas de agar foram incubadas durante 18 horas a 37 graus e as colónias correspondentes ao tempo 0 e ao tempo 1 foram contadas.

Análise de soros - western blots

As proteínas purificadas (500 ng/pista), vesículas de membrana externa (5 µg) e extractos de célula total (25 µg) derivados da estirpe MenB 2996 foram carregadas num gel de poliacrilamida SDS a 12 % e transferidas a uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada durante 2 horas a 150 mA a 4 °C, usando tampão de transferência (0,3 % de Tris base, 1,44 % de glicina, 20 % (v/v) de metanol). A membrana foi saturada por incubação durante a noite a 4 °C em tampão de saturação (10 % de leite magro, 0,1 % de Triton X 100 em PBS). A membrana foi lavada duas vezes com tampão de lavagem (3 % de leite magro, 0,1 % de Triton X100 em PBS) e incubada durante 2 horas a 37 °C com soros de ratinhos diluídos 1:200 em tampão de lavagem. A membrana foi lavada duas vezes e incubada durante 90 minutos com uma diluição 1:2000 de peroxidase de rábano silvestre marcada com Ig anti-ratinho. A membrana foi lavada duas vezes com 0,1 % de Triton X 100 em PBS e desenvolvida com o Kit de

Substrato Opti-4CN (Bio-Rad). A reacção foi interrompida por meio da adição de água.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> NOVARTIS VACINAS E DIAGNOSTICS S.R.L.
<120> EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE NEISSERIA
<130> P055385EP
<140> EP
<141> 2001-02-28
<150> GB 000469.3
<151> 2000-02-28
<150> GB 0027675.8
<151> 2000-11-13
<160> 10
<170> Seqwin99, versão 1.02
<210> 1
<211>1746
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Proteína híbrida
<400> 1

atggctagcc	ccgatgttaa	atcggcggac	acgctgtcaa	aaccggccgc	tcctgttggt	60
gctgaaaaag	agacagaggt	aaaagaagat	gcgccacagg	caggttctca	aggacagggc	120
gcgccatcca	cacaaggcag	ccaagatatg	gcggcagttt	cggcagaaaa	tacaggcaat	180
ggcgggtgcg	caacaacgga	caaaccctaa	aatgaagacg	agggaccgca	aaatgatatg	240
ccgcaaaatt	ccgccgaatc	cgcaaatcaa	acagggaaca	accaaccgcg	cgattcttca	300
gattccgccc	ccgcgtcaaa	ccctgcacct	gcgaatggcg	gtagcaattt	tggaaggggt	360
gatttggcta	atggcgtttt	gattgatggg	ccgtcgcaaa	atataacgtt	gacccactgt	420
aaaggcgatt	cttgtaatgg	tgataattta	ttggatgaag	aagcaccgtc	aaaatcagaa	480
tttgaaaatt	taaatgagtc	tgaacgaatt	gagaaatata	agaaagatgg	gaaaagcgat	540
aaatttacta	atgttggttc	gacagcagtt	caagctaattg	gaactaacia	atatgtcatc	600
atttataaag	acaagtccgc	ttcatcttca	tctgcgcgat	tcaggcggtc	tgacgggtcg	660
aggaggtcgc	ttcctgccga	gatgccgcta	atccccgtca	atcaggcgga	tacgtgattt	720
gtcgatgggg	aagcgggtcag	cctgacgggg	cattccggca	atatcttctc	gcccgaaggg	780
aattaccggt	atctgactta	cggggcgga	aaattgccc	gcggatcgta	tgccctccgt	840
gtgcaaggcg	aaccggcaaa	aggcgaaatg	cttgctggca	cggccgtgta	caacggcgaa	900
gtgctgcatt	ttcatacggg	aaacggccgt	ccgtaccgca	ctagaggcag	gtttgccgca	960
aaagtgcgatt	tcggcagcaa	atctgtggac	ggcattatcg	acagcggcga	tgatttgcatt	1020
atgggtacgc	aaaaattcaa	agccgccatc	gatggaaacg	gctttaaggg	gacttggacg	1080
gaaaaatgag	gcggggatgt	ttccggaagg	ttttacggcc	cggccggcga	ggaagtggcg	1140
ggaaaaatata	gctatcgccc	gacagatgcg	gaaaaggggc	gattcggcgt	gtttgccggc	1200
aaaaaagagc	aggatggatc	cggaggagga	ggagccacct	acaaagtggg	cgaatatcac	1260
gccaacgccc	gtttcgccat	cgaccatttc	aacaccagca	ccaacgtcgg	cggtttttac	1320
ggtctgaccg	gttcgcgtcg	gttcgaccaa	gcaaaacgcg	acggtaaaat	cgacatcacc	1380
atccccgttg	ccaacctgca	aagcggttcg	caacacttta	ccgaccacct	gaaatcagcc	1440
gacatcttcg	atgccgcca	atatccggac	atccgctttg	tttccaccaa	attcaacttc	1500
aacggcaaaa	aactggtttc	cgttgacggc	aacctgacca	tgacaggcaa	aaccgcccc	1560
gtcaaaactca	aagccgaaaa	attcaactgc	taccaaagcc	cgatggcgaa	aaccgaagtt	1620
tgcgggcgcg	acttcagcac	caccatcgac	cgcaccaa	ggggcggtga	ctacctcggt	1680
aacgtttggt	tgacaaaaag	cgtccgcata	gacatccaaa	tcgaggcagc	caaacaataa	1740
ctcgag						1746

<210>2

<211>579

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Proteína híbrida

<400>2

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>3

<211> 1941

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Proteína híbrida

<400> 3

atggctagcc	ccgatgtcaa	gtcggcggac	acgctgtcaa	aacctgccgc	ccctgttggt	60
tctgaaaaag	agacagaggc	aaaggaagat	gcgccacagg	caggttctca	aggacagggc	120
gcgccatccg	cacaaggcgg	tcaagatatg	gcggcggttt	cggaagaaaa	tacaggcaat	180
ggcgggtgcg	cagcaacgga	caaacccaaa	aatgaagacg	agggggcgca	aaatgatatg	240
ccgcaaaatg	ccgccgatac	agatagtttg	acaccgaatc	acaccccggc	ttcgaatatg	300
ccggccggaa	atatggaaaa	ccaagcaccg	gatgccgggg	aatcggagca	gccggcgaac	360
caaccggata	tggcaaatat	ggcggacgga	atgcagggtg	acgatccgtc	ggcaggcggg	420
gaaaaatgcc	gcaatacggc	tgcccaagggt	acaaatcaag	ccgaaaacaa	tcaaaccgcc	480
ggttctcaaa	atcctgcctc	ttcaaccaat	cctagcgcca	cgaatagcgg	tggtgatattt	540
ggaaggacga	acgtgggcaa	ttctgtttgt	attgacgggc	cgtcgcacaaa	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	cctaaaacca	cttcatttgc	gcgatttagg	840
cgttctgcac	ggtcgaggcg	gtcgcctccg	gccgagatgc	cgctgattcc	cgtaaatcag	900
gcggatacgc	tgattgtcga	tggggaagcg	gtcagcctga	cggggcattc	cggcaatatc	960
ttcgcgcccc	aagggaatta	ccggtatctg	acttacgggg	cggaataatt	gcccgcgcga	1020

tcgtatgcc	tccgtgttca	aggcgaacct	tcaaaaggcg	aaatgctcgc	gggcacggca	1080
gtgtacaaag	gcgaagtgc	gcattttcat	acggaaaaacg	gccgtccgtc	cccgtccaga	1140
ggcagggtttg	ccgcaaaagt	cgattttcggc	agcaaatctg	tggacggcat	tatcgacagc	1200
ggcgtatggtt	tgcatatggg	tacgcaaaaa	ttcaaaagccg	ccatcgatgg	aaacggcttt	1260
aaggggactt	ggacggaaaa	tggcggcggg	gatgtttccg	gaaagtttta	cggccccggcc	1320
ggcgaggaag	tggcgggaaa	atacagctat	cgcccaacag	atgcggaaaa	gggaggattc	1380
ggcgtgtttg	ccggcaaaaa	agagcaggat	ggatccggag	gaggaggagc	cacctacaaa	1440
gtggacgaat	atcacgccaa	cgccccgtttc	gccatcgacc	atttcaacac	cagcaccaac	1500
gtcggcggtt	tttacggtct	gaccgggttcc	gtcgagtctg	accaagcaaa	acgcgacggg	1560
aaaatcgaca	tcaccatccc	cgtttgccaac	ctgcaaaagcg	gttcgcaaca	ctttaccgac	1620
cacctgaaat	cagccgacat	cttcgatgcc	gcccataatc	cggacatccg	ctttgtttcc	1680
accaaattca	acttcaacgg	caaaaaactg	gtttccggtg	acggcaacct	gaccatgcac	1740
ggcaaaaccg	cccccgtaaa	actcaaaagcc	gaaaaattca	actgctacca	aagcccgatg	1800
gcgaaaaccg	aagtttgcg	cggcgacttc	agcaccacca	tcgaccgcac	caaatggggc	1860
gtggactacc	tcgttaacgt	tggatatgacc	aaaagcgctc	gcacgcacat	ccaaatcgag	1920
gcagccaaac	aataaaagct	t				1941

<210>4

<211>644

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Proteína híbrida

<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 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 ₂₄₅	Asn	Asp	Lys	Phe	Val ₂₅₀	Gly	Leu	Val	Ala	Asp ₂₅₅ Ser
Val	Gln	Met	Lys ₂₆₀	Gly	Ile	Asn	Gln	Tyr ₂₆₅	Ile	Ile	Phe	Tyr	Lys ₂₇₀	Pro Lys
Pro	Thr	Ser ₂₇₅	Phe	Ala	Arg	Phe	Arg ₂₈₀	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser ₂₈₅	Arg	Arg Ser
Leu	Pro ₂₉₀	Ala	Glu	Met	Pro	Leu ₂₉₅	Ile	Pro	Val	Asn	Gln ₃₀₀	Ala	Asp	Thr Leu
Ile ₃₀₅	Val	Asp	Gly	Glu	Ala ₃₁₀	Val	Ser	Leu	Thr	Gly ₃₁₅	His	Ser	Gly	Asn Ile ₃₂₀
Phe	Ala	Pro	Glu	Gly ₃₂₅	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Leu ₃₃₀	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu ₃₃₅ Lys
Leu	Pro	Gly	Gly ₃₄₀	Ser	Tyr	Ala	Leu	Arg ₃₄₅	Val	Gln	Gly	Glu	Pro ₃₅₀	Ser Lys
Gly	Glu	Met ₃₅₅	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala ₃₆₀	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu ₃₆₅	Val	Leu His
Phe	His ₃₇₀	Thr	Glu	Asn	Gly	Arg ₃₇₅	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg ₃₈₀	Gly	Arg	Phe Ala
Ala ₃₈₅	Lys	Val	Asp	Phe	Gly ₃₉₀	Ser	Lys	Ser	Val	Asp ₃₉₅	Gly	Ile	Ile	Asp Ser ₄₀₀
Gly	Asp	Gly	Leu	His ₄₀₅	Met	Gly	Thr	Gln	Lys ₄₁₀	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile ₄₁₅ Asp
Gly	Asn	Gly	Phe ₄₂₀	Lys	Gly	Thr	Trp	Thr ₄₂₅	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly ₄₃₀	Asp Val
Ser	Gly	Lys ₄₃₅	Phe	Tyr	Gly	Pro	Ala ₄₄₀	Gly	Glu	Glu	Val	Ala ₄₄₅	Gly	Lys Tyr
Ser	Tyr ₄₅₀	Arg	Pro	Thr	Asp	Ala ₄₅₅	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe ₄₆₀	Gly	Val	Phe Ala
Gly ₄₆₅	Lys	Lys	Glu	Gln	Asp ₄₇₀	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly ₄₇₅	Gly	Ala	Thr	Tyr Lys ₄₈₀
Val	Asp	Glu	Tyr	His ₄₈₅	Ala	Asn	Ala	Arg	Phe ₄₉₀	Ala	Ile	Asp	His	Phe Asn ₄₉₅
Thr	Ser	Thr	Asn ₅₀₀	Val	Gly	Gly	Phe	Tyr ₅₀₅	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser ₅₁₀	Val Glu
Phe	Asp	Gln ₅₁₅	Ala	Lys	Arg	Asp	Gly ₅₂₀	Lys	Ile	Asp	Ile	Thr ₅₂₅	Ile	Pro Val
Ala	Asn ₅₃₀	Leu	Gln	Ser	Gly	Ser ₅₃₅	Gln	His	Phe	Thr	Asp ₅₄₀	His	Leu	Lys Ser
Ala ₅₄₅	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala ₅₅₀	Ala	Gln	Tyr	Pro	Asp ₅₅₅	Ile	Arg	Phe	Val Ser ₅₆₀
Thr	Lys	Phe	Asn	Phe ₅₆₅	Asn	Gly	Lys	Lys	Leu ₅₇₀	Val	Ser	Val	Asp	Gly ₅₇₅ Asn
Leu	Thr	Met	His ₅₈₀	Gly	Lys	Thr	Ala	Pro ₅₈₅	Val	Lys	Leu	Lys	Ala ₅₉₀	Glu Lys
Phe	Asn	Cys	Tyr	Gln	Ser	Pro	Met	Ala	Lys	Thr	Glu	Val	Cys	Gly Gly

595					600					605					
Asp	Phe	Ser	Thr	Thr	Ile	Asp	Arg	Thr	Lys	Trp	Gly	Val	Asp	Tyr	Leu
	610					615					620				
Val	Asn	Val	Gly	Met	Thr	Lys	Ser	Val	Arg	Ile	Asp	Ile	Gln	Ile	Glu
625					630					635					640

Ala Ala Lys Gln

<210>5

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 5

ctagctagcgg ggggcggcgg tggcg 25

<210>6

<211> 31

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 6

cccgctcgag tcaatcctgc tcttttttgc c 31

<210>7

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 7

gggaattcca tatgaaaaaa atcatcttcg ccg 33

<210>8

<211> 31

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 8
cccgcctcgag ttattgtttg gctgcctcga t 31
<210>9
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Iniciador
<400> 9
gggaattcca tatggccacc tacaaagtgg acg 33
<210> 10
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Iniciador
<400> 10
cggggatcct tgtttggctg cctcgatttg 30

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente Europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente citados na descrição

- WO 9924578 A [0002]
- WO 9936544 A [0002]
- WO 9957280 A [0002] [0004] [0028]
- WO 00230 A [0002]
- WO 0066741 A [0021] [0027]
- GB 000469 A [0079]
- GB 0027675 A [0079]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Evans.** *Infert.Immun.*, 1974, vol. 10, 1010-1017 [0049]
- **Filip.** *J.Bact.*, 1973, vol. 115, 717-722 [0069]
- **Davies.** *J.Immunol.Meth.*, 1990, vol. 143, 215-225 [0069]

REIVINDICAÇÕES

1. Uma proteína híbrida, em que a proteína compreende:
 - a) uma das sequências SEQ ID NO 2 ou 4; ou
 - b) uma sequência que tem mais de 70 % de identidade de sequência com uma das SEQ ID NO 2 ou 4.
2. Uma proteína híbrida de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína compreende uma sequência que tem 80 % de identidade de sequência com uma das SEQ ID NOs: 2 ou 4.
3. Uma proteína híbrida de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína compreende uma sequência que tem 90 % de identidade de sequência com uma das SEQ ID NOs: 2 ou 4.
4. Um ácido nucleico que codifica a proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3.
5. Um vector que contém o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4.
6. Uma célula hospedeira que contém o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4 ou o vector de acordo com a reivindicação 5.
7. Uma composição imunogénica ou de diagnóstico que compreende a proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3.
8. A proteína de acordo com a reivindicação 1, ou a composição de acordo com a reivindicação 7 para utilização num método de tratamento ou prevenção de infecção devido a bactérias do género *Neisseria*.

9. Um método para a expressão de uma proteína híbrida, em que a proteína compreende:

- a) uma das sequências SEQ ID NO: 2 ou 4; ou
- b) uma sequência que tem mais de 70 % de identidade de sequência com uma das SEQ ID NO 2 ou 4.

10. O método de acordo com a reivindicação 9, em que a proteína compreende uma sequência que tem 80 % de identidade de sequência com uma das SEQ ID NOS: 2 ou 4.

11. O método de acordo com a reivindicação 9, em que a proteína compreende uma sequência que tem 90 % de identidade de sequência com uma das SEQ ID NOS: 2 ou 4.

FIG. 1A — ΔG287—953

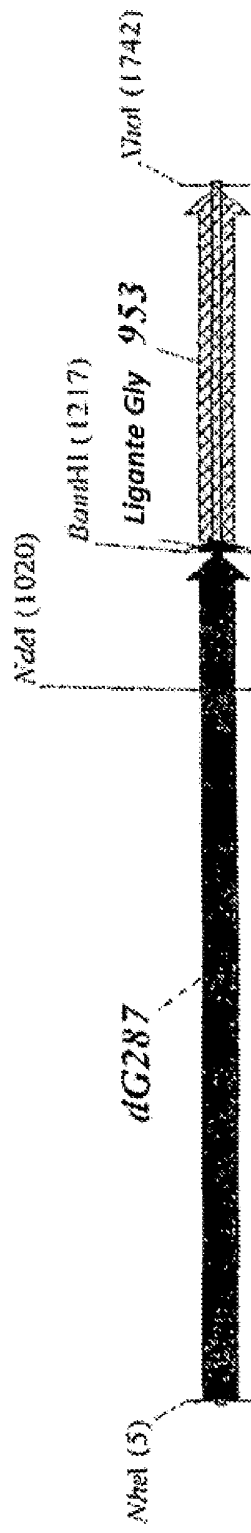


FIG. 1B — ΔG287NZ—953

