

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

(22) Data de pedido: 2002.09.06	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L. VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA (SI)	IT
(30) Prioridade(s): 2001.09.06 GB 0121591		
(43) Data de publicação do pedido: 2004.06.02	(72) Inventor(es): MARIAGRAZIA PIZZA	IT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.01.19 048/2011	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **EXPRESSÃO HÍBRIDA E EM SÉRIE DE PROTEÍNAS DE NEISSERIA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO DIZ RESPEITO A DUAS OU MAIS PROTEÍNAS DE NEISSERIA QUE SÃO UNIDAS DE TAL MODO TAL QUE SÃO TRADUZIDAS COMO UMA CADEIA POLIPEPTÍDICA INDIVIDUAL. AS PROTEÍNAS HÍBRIDAS SÃO REPRESENTADAS PELA FÓRMULA GERAL NH₂-A-[-X-L-]N-B-COOH, EM QUE O SÍMBOLO X REPRESENTA UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO, O SÍMBOLO L REPRESENTA UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO DE LIGAÇÃO FACULTATIVA, O SÍMBOLO A REPRESENTA UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO DO TERMINAL N, O SÍMBOLO B REPRESENTA UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO DO TERMINAL C FACULTATIVA E O SÍMBOLO N REPRESENTA UM NÚMERO INTEIRO SUPERIOR A I. AS PROTEÍNAS EM QUE CADA UM DOS N RADICAIS - X- PARTILHA UMA IDENTIDADE DE SEQUÊNCIA COM OS OUTROS RADICAIS ¿X-, SÃO CONSIDERADAS UMA "PROTEÍNA EM SÉRIE".

RESUMO**"EXPRESSÃO HÍBRIDA E EM SÉRIE DE PROTEÍNAS DE NEISSERIA"**

A invenção diz respeito a duas ou mais proteínas de *Neisseria* que são unidas de tal modo tal que são traduzidas como uma cadeia polipeptídica individual. As proteínas híbridas são representadas pela fórmula geral $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que o símbolo X representa uma sequência de aminoácido, o símbolo L representa uma sequência de aminoácido de ligação facultativa, o símbolo A representa uma sequência de aminoácido do terminal N, o símbolo B representa uma sequência de aminoácido do terminal C facultativa e o símbolo n representa um número inteiro superior a 1. As proteínas em que cada um dos n radicais -X- partilha uma identidade de sequência com os outros radicais -X-, são consideradas uma "proteína em série".

DESCRIÇÃO

"EXPRESSÃO HÍBRIDA E EM SÉRIE DE PROTEÍNAS NEISSERIA"

Todos os documentos citados são aqui incorporados na sua totalidade por referência.

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção pertence ao campo da expressão de proteínas. Em particular, a invenção diz respeito à expressão de proteínas de *Neisseria* (v.g., *N. gonorrhoeae* ou, de preferência, *N. meningitidis*).

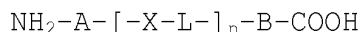
ANTECEDENTES DA TÉCNICA

As referências 1 e 2 dizem respeito a abordagens alternativas e melhoradas para a expressão das proteínas de *Neisseria* descritas nas referências 3 a 6. Tal método consiste na produção de proteínas "híbridas", em que duas ou mais proteínas de *Neisseria* são expressas como uma cadeia polipeptídica individual. Esta abordagem apresenta duas vantagens. Em primeiro lugar, uma proteína que pode ser instável ou apresentar uma expressão fraca por si só pode ser assistida por meio da adição de um parceiro híbrido adequado que permita ultrapassar o problema. Em segundo lugar, a produção comercial é simplificada, uma vez que apenas é necessário utilizar uma expressão e purificação para a produção de duas proteínas separadas úteis.

Constitui um objecto da presente invenção proporcionar outras abordagens alternativas e melhoradas para a expressão de proteínas de *Neisseria*.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A invenção proporciona uma proteína híbrida que satisfaz a fórmula geral:



em que o símbolo L representa uma sequência de aminoácido de ligação facultativa, o símbolo A representa uma sequência de aminoácido do terminal N facultativa, o símbolo B representa uma sequência de aminoácido do terminal C facultativa e o símbolo $n = 2$,

(i) o símbolo X_1 representa

(a) a sequência de 936 aminoácidos de *N. meningitidis* (SEQ ID 2884 do documento WO 99/57280)

```

1  MNFKPHIVRT LIAAIFSLAL SCCVSAVIGS AAVGAKSAVD RRTTGAQTDD
51  NVMALRIETT ARSYLRQNNQ TKGYTPQISV VGYNRHLLL QVATEGEKQ
101 FVGQIANSEQ AAEGVVNYIT VASLPRTAGD IAGDTNNTSK VRATLLGISF
151 ATQARVKIIV YGNVTYVMGI LTFEEQAQIT QKVSTTVGVQ KVTITLVQNYV
201 QR,
```

ou

(b) uma sequência de aminoácidos que possui uma identidade de sequência de 90% ou superior com a sequência de aminoácido de (a) e

(ii) o símbolo X_2 representa

(a) a sequência de 741 aminoácidos de *N. meningitidis* (SEQ ID 2536 do documento WO 99/57280)

```

1  VNRTAFPCLS LTTALILTAC SSGEGEVAAD IGAGLADALT AFLNKKKQGL
51  QSLTLOQSVR KNEKLKLAQ GAERTYGNQD SLNTGKLNQ KVSAPDFIQ
101 IEVDEQLITL ESSEFQVYKQ SHSALTAQOT EQIQSEHSG KHVAKRQFRI
151 GDIAGEHTSF DKLPECGRAT YRGTAFGSDQ AGGKLTYYID FFAKQGGKXI
201 ENLSSPELVN DLAADIKPD GKRHAIVSGS VLYNQAERGS YSLGIFGCKA
251 QEVAGSAEVK TVNGIRHIGL AAKQ,
```

(b) uma sequência de aminoácidos que compreende a sequência de (a) com uma supressão no terminal N até, e incluindo, o resíduo 26 da sequência de aminoácidos de (a) ou

(c) uma sequência de aminoácidos que possui uma identidade de sequência de 90% ou superior com a sequência de aminoácido de (a) ou (b).

Proteínas híbridas

Assim, a invenção proporciona um método para a expressão simultânea de duas proteínas de *Neisseria*, em que as referidas duas ou mais proteínas são unidas de um modo tal que são traduzidas como uma cadeia polipeptídica individual. De um modo geral, as proteínas híbridas da invenção podem ser representadas pela fórmula geral: $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que o símbolo X representa uma sequência de aminoácido, o símbolo L representa uma sequência de aminoácido de ligação facultativa, o símbolo A representa uma sequência de aminoácidos do terminal N facultativa, o símbolo B representa uma sequência de aminoácidos facultativa do terminal C e o símbolo n representa 2.

Os radicais -X-

Os dois radicais -X- são 741 ou

(b) uma sequência de aminoácidos que possui uma identidade de sequência de 90% ou superior com a sequência de aminoácido de (a).

No caso de um radical -X- possuir uma sequência peptídica líder na sua forma de tipo selvagem, a qual pode ser incluída ou omitida nas proteínas híbridas descritas na forma de comprimento completo, então está preferencialmente na extremidade do terminal C de uma proteína híbrida; no caso de se pretender utilizar no terminal N, então é preferível utilizar a forma AG de 741.

Os radicais -L-

Para cada um dos n casos de $[-X-L-]$, a sequência de aminoácidos de ligação, $-L-$, pode estar presente ou ausente. Por exemplo, no caso de $n = 2$, o híbrido pode ser $NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH$, etc..

Tipicamente, a(s) sequência(s) de aminoácidos de ligação, $-L-$, irão ser curtas (v.g., de 20 ou menos aminoácidos, isto é, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Como exemplos refere-se as sequências curtas de péptidos que facilitam a clonagem, os sequências de ligação de poliglicina (isto é, Gly_n , em que $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais) e marcadores de histidina (isto é, His^n , em que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais). Outras sequências de aminoácidos de ligação adequadas serão evidentes para os especialistas na matéria. Uma sequência de ligação útil é GSGGGG (SEQ ID 27), em que o dipéptido Gly-Ser é formado a partir de um local de restrição *Bam*HI, permitindo assim a clonagem e manipulação, sendo o tetrapéptido Gly_4 uma sequência de ligação poliglicina típica.

No caso de X_{n+1} ser uma proteína ΔG e L_n ser uma sequência de ligação de glicina, então pode ser equivalente a X_{n+1} , em que não é uma proteína ΔG e L_n está ausente.

O radical -A-

O radical $-A-$ é uma sequência de aminoácidos facultativa do terminal N. Tipicamente, será pequena (v.g., de 40 aminoácidos ou inferior, isto é, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4,

3, 2, 1). Como exemplos refere-se as sequências líder para dirigir o trânsito de proteínas ou cadeias curtas de péptidos que facilitem a clonagem ou purificação (v.g., marcadores de histidina, isto é, His_n , em que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou superior). Outras sequências de aminoácidos do terminal N serão evidentes para os especialistas na matéria. No caso de X_1 não apresentar a sua própria metionina no terminal N, então -A- pode ser um resíduo metionina.

O radical -B-

O radical -B- é uma sequência de aminoácidos facultativa do terminal C. Tipicamente, será pequena (v.g., de 40 aminoácidos ou inferior, isto é, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Como exemplos refere-se sequências para dirigir o trânsito de proteínas, cadeias curtas de péptidos que facilitem a clonagem ou purificação (v.g., que compreendam marcadores de histidina, isto é, His_n , em que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou superior) ou sequências que aumentem a estabilidade das proteínas. Outras sequências de aminoácidos do terminal C serão evidentes para os especialistas na matéria.

Formas polimórficas de proteínas

A invenção pode utilizar sequências de aminoácidos obtidas a partir de quaisquer estirpes de *N. meningitidis*. Referências a uma proteína particular incluem a proteína de qualquer estirpe. As variações de sequências entre as estirpes estão abrangidas por (b).

As sequências de referência obtidas a partir do serogrupo B de *N. meningitidis* compreendem:

a listagem de sequências das formas polimórficas das proteínas 741 (SEQ ID 1 a 22), que tenham sido identificadas.

Serogrupos e estirpes

As proteínas preferidas de acordo com a invenção compreendem radicais -X- que possuem a sequência de aminoácidos encontrada no serogrupo B de *N. meningitidis*. Numa proteína individual da presente invenção, os radicais -X- individuais podem ser provenientes de uma ou de várias estirpes. Por exemplo, o radical X_2 pode ser da mesma estirpe do radical X_1 ou de uma estirpe diferente.

No serogrupo B, os radicais -X- preferidos são provenientes das estirpes 2996, MC58, 95N477 ou 394/98. Por vezes, a estirpe 95N477 é aqui designada como 'ET-37', sendo este o seu tipo electroforético. Por vezes, a estirpe 394/98 é aqui designada como 'nz', uma vez que é uma estirpe da Nova Zelândia.

De preferência, 741 é proveniente das estirpes MC58, 2996, 394/98 ou 95N477 do serogrupo B ou proveniente da estirpe 90/18311 do serogrupo C.

As estirpes são indicadas como índice inferior, v.g., a 741_{MC58} é a proteína 741 proveniente da estirpe MC58. Salvo quando indicado de outro modo, as proteínas aqui referidas (v.g., sem índice inferior) são provenientes da estirpe 2996 de *N. meningitidis*, que pode ser considerada como a estirpe de 'referência'. No entanto, faz-se observar que a invenção não é limitada em geral pela estirpe. Tal como referido antes, as referências gerais a uma proteína

podem ser consideradas para a inclusão de uma proteína de qualquer estirpe. Estas apresentam uma identidade de sequência em relação à 2996 tipicamente de 90% ou superior (v.g., 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou superior).

Sequências

A invenção também proporciona uma proteína que possui uma sequência de aminoácidos proveniente das SEQ ID 1 a 22. Também proporciona proteínas e ácidos nucleicos que possuem uma identidade de sequência com estas. Tal como descrito antes, o grau de 'identidade de sequência' é superior a 90%.

A invenção proporciona ácidos nucleicos que codificam tais proteínas.

A invenção proporciona ainda ácidos nucleicos que codificam proteínas de acordo com a invenção.

Faz-se observar ainda que a invenção proporciona ácidos nucleicos que compreendem sequências complementares às sequências descritas antes (v.g., para fins de anti-sentido ou de sondas).

Os ácidos nucleicos de acordo com a invenção podem ser evidentemente preparados de diversos modos (v.g., síntese química, a partir de bancos genómicos ou de ADNc, a partir do próprio organismo, etc.) e podem assumir diversas formas (v.g., cadeia individual, cadeia dupla, vectores, sondas, etc.).

Além disso, o termo "ácido nucleico" compreende ADN e ARN, bem como os seus análogos, tais como os que contêm as estruturas modificadas e ainda ácidos nucleicos peptídicos (PNA), etc..

Misturas

A invenção também proporciona uma composição que compreende duas ou mais (isto é, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7) das proteínas seguintes:

- (1) 287
- (2) 741
- (3) ORF46.1
- (4) 961
- (5) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $X_1 = 287$, $X_2 = 953$
- (6) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $X_1 = 287$, $X_2 = 919$
- (7) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $X_1 = 287$, $X_2 = 961$

A mistura pode compreender uma ou várias das proteínas seguintes, quer em combinação com duas ou mais das proteínas (1) a (7) quer em combinação com apenas uma das proteínas (1) a (7):

- (8) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $X_1 = 287$, $X_2 = 741$
- (9) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $X_1 = 936$, $X_2 = 741$

Quando as proteínas 287 e 741 estão incluídas na mistura (isto é, na proteína 1, 2, 5, 6, 7 ou 8), então podem estar sob a forma ' ΔG '.

Quando a proteína 961 está incluída, então está preferencialmente na forma de '961 c', em que o líder do terminal N e a membrana de ancoragem do terminal C estão ausentes [v.g., ver referências 1, 2 e 11].

Uma mistura preferida compreende as três proteínas seguintes:

(1) 961c, de preferência 961c₂₉₉₆ (v.g., aqui SEQ ID 31);

(2) NH₂-A-[-X-L-]_n-B-COOH, em que n é 2, -X₁- é ΔG287 (de preferência ΔG287_{NZ}), -X₂- é 953 (de preferência 953₂₉₉₆) à qual falta o seu péptido líder, -L₁- é GSGGGG e -A- compreende uma metionina no terminal N (v.g., -A- é M ou MA) (v.g., aqui SEQ ID 28 e 29) e

(3) NH₂-A-[-X-L-]_n-B-COOH, em que n = 2, X₁ = 936 (de preferência 936₂₉₉₆), X₂ = ΔG741 (de preferência ΔG741_{MC58}), L₁ = GSGGGG (v.g., aqui SEQ ID 30).

As misturas também podem compreender vesículas membranares exteriores de *N. meningitidis*.

Hospedeiro heterólogo

Embora a expressão das proteínas da presente invenção possa ter lugar em *Neisseria*., a presente invenção utiliza preferencialmente um hospedeiro heterólogo. O hospedeiro heterólogo pode ser um procariótico (v.g., uma bactéria) ou um eucariótico. De preferência, é *E. coli*, mas como outros hospedeiros adequados refere-se *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (v.g., *M. tuberculosis*), leveduras, etc.

Vectores etc.

A invenção proporciona (a) ácidos nucleicos que codificam as proteínas descritas antes, (b) vectores que compreendem estas sequências de ácidos nucleicos, (c) células hospedeiras que contêm os referidos vectores, (d) composições que compreendem as proteínas ou os ácidos nucleicos da invenção, as quais podem ser adequadas

enquanto composições imunogénicas (v.g., vacinas) ou enquanto reagentes de diagnóstico, (e) tais composições para utilização enquanto medicamentos (v.g., como vacinas) ou enquanto reagentes de diagnóstico, (f) a utilização dessas composições para a produção de (1) um medicamento para o tratamento ou para a prevenção de uma infecção provocada por uma bactéria *Neisseria*, (2) um reagente de diagnóstico para a detecção da presença de uma bactéria *Neisseria* ou de anticorpos contra a bactéria *Neisseria* e/ou (3) um reagente que faz aumentar os anticorpos contra uma bactéria *Neisseria* e (g) um método para o tratamento de um paciente, o qual compreende a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz destas composições.

Tipicamente, a implementação da invenção irá envolver os passos básicos que consistem em: obter um primeiro ácido nucleico que codifique uma primeira proteína; obter um segundo ácido nucleico que codifique uma segunda proteína e ligar os primeiro e segundo ácidos nucleicos. O ácido nucleico resultante poderá ser inserido num vector de expressão ou poderá já fazer parte de um vector de expressão.

Para aumentar a solubilidade, a purificação de proteínas híbridas podem implicar as técnicas de dobramento aqui descritas.

Composições imunogénicas e medicamentos

De preferência, as composições da invenção são composições imunogénicas e, mais preferencialmente, composições para vacinas. De preferência, o valor de pH da composição está compreendido entre 6 e 7. O pH pode ser

mantido por meio da utilização de um tampão. A composição pode ser estéril.

As vacinas de acordo com a invenção podem ser profilácticas (isto é, para prevenir a infecção) ou terapêuticas (isto é, para tratar a infecção), mas serão preferencialmente profilácticas.

A invenção também proporciona uma composição da invenção utilizável enquanto medicamento. De preferência, o medicamento é capaz de potenciar uma resposta imune num mamífero (isto é, é uma composições imunogénica) e é, mais preferencialmente, uma vacina.

A invenção também proporciona a utilização de uma composição da invenção para a preparação de um medicamento para potenciar uma resposta imune num mamífero. De preferência, o medicamento é uma vacina.

A invenção proporciona ainda um método para potenciar uma resposta imune num mamífero, o qual compreende o passo de administrar uma quantidade eficaz de uma composição da invenção. De preferência, a resposta imune é protectora. O método pode potenciar uma resposta reforçada.

De preferência, o mamífero é um ser humano. No caso de a vacina ser para uma utilização profiláctica, então o ser humano é preferencialmente uma criança (v.g., uma criança que está a começar a andar ou um bebé); no caso de a vacina ser para uma utilização profiláctica, então o ser humano é preferencialmente um adulto. Uma vacina concebida para crianças também poderá ser administrada a adultos, v.g., para verificar a segurança, a dosagem, a imunogenicidade, etc.

De preferência, as utilizações e os métodos dizem respeito à prevenção e/ou ao tratamento de uma doença

provocada por uma *Neisseria* (v.g., meningite, septicemia, gonorreia, etc.). É preferível para a prevenção e/ou para o tratamento de meningite bacteriana.

Outros componentes da composição

Tipicamente, a composição da invenção irá compreender, para além dos componentes referidos antes, um ou vários veículos farmacêuticamente aceitáveis, os quais incluem quaisquer veículos que não induzam, eles próprios, a produção de anticorpos nocivos para o indivíduo que recebe a composição. Como veículos adequados refere-se tipicamente grandes macromoléculas metabolizadas lentamente, tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, tre-halose (WO 00/56365) e agregados de lípidos (tais como gotas oleosas e lipossomas). Tais veículos são bem conhecidos pelos especialistas na matéria. As vacinas também podem conter diluentes, tais como água, soluto salino, glicerol, etc. Além disso, também podem estar presentes substâncias auxiliares, tais como agentes humectantes ou emulsionantes, substâncias tampão de pH e semelhantes. Para uma discussão mais minuciosa sobre excipientes farmacêuticamente aceitáveis veja-se a obra *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

As composições imunogénicas utilizadas como vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de antigénio, bem como de qualquer outros dos componentes supramencionados, consoante necessário. A expressão "quantidade imunologicamente eficaz" pretende designar que a administração dessa quantidade a um indivíduo, quer seja como dose individual quer seja como uma parte de um

conjunto de doses, é eficaz para o tratamento ou para a prevenção. Tal quantidade varia em função do estado de saúde e da condição física do indivíduo que se pretende tratar, da idade, do grupo taxonómico do indivíduo que se pretende tratar (v.g., primata não humano, primata, etc.), da capacidade do sistema imune do indivíduo para sintetizar anticorpos, do nível de protecção desejado, da formulação da vacina, do julgamento médico para tratar a situação médica e de outros factores relevantes. É esperado que a quantidade esteja compreendida num intervalo relativamente amplo e que possa ser determinado por ensaios de rotina. A dosagem de tratamento pode ser num regime de dose individual ou num regime de doses múltiplas (v.g., incluindo doses reforçadas). A vacina pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunorreguladores.

A vacina pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunorreguladores.

A composição pode compreender outros adjuvantes para além (ou em vez de) do sal de alumínio. Como adjuvantes preferidos para potenciar a eficácia da composição refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação: (1) formulações em emulsão do tipo óleo-em-água (na presença ou na ausência de outros agentes imuno-estimuladores específicos, tais como péptidos de muramilo (ver adiante) ou componentes da parede celular bacteriana), tais como, por exemplo, (a) MF59™ (WO 90/14837, capítulo 10 na ref. 13), que contém 5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80 e 0,5% de Span 85 (e contém facultativamente MTP-PE), formulado em partículas submicron utilizando um microfluidificador, (b) SAF, contendo 10% de esqualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado com plurónico e thr-MDP

microfluidificado numa emulsão submícron ou preparado num vórtice para se obter uma emulsão com um tamanho grande de partículas e (c) (c) sistema adjuvante Ribi™ (RAS) (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), contendo 2% de esqualeno, 0,2% de Tween 80 e um ou vários componentes de parede celular bacteriana provenientes do grupo constituído por monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de tre-halose (TDM) e esqueleto de parede celular (CWS) e de preferência MPL + CWS (Detox™); (2) adjuvantes de saponina, tais como QS21 ou Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) podem ser utilizados, ou partículas geradas a partir destes, tais como ISCOM (complexos imuno-estimuladores), ISCOM que podem ser destituídos de um detergente suplementar, *v.g.*, WO 00/07621; (3) adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante incompleto de Freund (IFA); (4) citocinas, tais como interleucinas (*v.g.*, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO 99/44636), *etc.*), interferões (*v.g.*, interferão γ), factor estimulador da colónia de macrófagos (M-CSF), factor de necrose tumoral (TNF), *etc.*; (5) monofosforil-lípido A (MPL) ou MPL 3-0-desacetado (3dMPL), *v.g.*, GB-2220221, EP-A-0689454; (6) combinações de 3dMPL, por exemplo, com QS21 e/ou emulsões do tipo óleo-em-água, *v.g.*, EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleótidos que compreendem motivos CpG [Krieg Vaccine 2000, 19, 618-622; Krieg Curr- opin Mol Ther 2001 3:15-24; Roman *et al.*, Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, J. Immunol., 1998, 160, 870-876; Chu *et al.*, J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg *et al.*, Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*,

PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, J. Immunol. 1998, 160, 4755-4761; e Yi *et al.*, J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906; pedidos de patente de invenção internacionais n^{os} WO 96/02555, WO 98/6247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 e WO 98/52581], isto é, que contêm pelo menos um dinucleótido CG, sendo facultativamente utilizada 5-metilcitosina em vez de citosina; (8) um éter de polioxietileno ou um éster de polioxietileno, *v.g.*, WO 99/52549; (9) um tensioactivo de éster de polioxietileno-sorbitano em combinação com um octoxinol (*v.g.*, WO 01/21207) ou um tensioactivo de éter ou éster alquílico de polioxietileno em combinação pelo menos com um tensioactivo não iónico suplementar, tal como um octoxinol (*v.g.*, WO 01/21152); (10) um oligonucleótido imuno-estimulador (*v.g.*, um oligonucleótido CpG) e uma saponina, *v.g.*, WO 00/62800; (11) um imuno-estimulante e uma partícula de um sal metálico, *v.g.*, WO 00/23105; (12) uma saponina e uma emulsão de tipo óleo-em-água, *v.g.*, WO 99/11241; (13) uma saponina (*v.g.*, QS21) + 3dMPL + OL-12 (facultativamente + um esterol), *v.g.*, WO 98/57659; (14) outras substâncias que actuem como agentes imuno-estimuladores para aumentar a eficácia da composição.

Como péptidos de muramilo refere-se N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nonuramil-L-

alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc..

Outros antigénios

Como outros antigénios que é possível incluir na composição da invenção refere-se:

- uma preparação de vesícula da membrana exterior (OMV) proveniente do serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como a descrita nas refs. 14, 15, 16, 17, etc.
- Um antigénio de sacárido proveniente dos serogrupos A, C, W135 e/ou Y de *N. meningitidis*, tal como o oligossacárido descrito na ref. 18 do serogrupo C [ver também ref. 19] ou o oligossacárido da ref. 20.
- Um antigénio de sacárido proveniente de *Streptococcus pneumoniae* [v.g., refs. 21, 22, 23].
- Um antigénio de proteína proveniente de *Helicobacter pylori*, tal como CagA [v.g., 24], VacA [v.g., 24], NAP [v.g., 25], HopX [v.g., 26], HopX [v.g., 26] e/ou urease.
- Um antigénio proveniente do vírus da hepatite A, tal como vírus inactivado [v.g., 27, 28].
- Um antigénio proveniente do vírus da hepatite B, tal como os antigénios da superfície e/ou do núcleo [v.g., 28, 29].
- Um antigénio proveniente do vírus da hepatite C [v.g., 30].
- Um antigénio proveniente de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina pertussis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) proveniente de *B. pertussis*, facultativamente também em combinação com pertactina e/ou aglutinogénios 2 e 3 [v.g., refs. 31 e 32].

- Um antígeno de difteria, tal como um toxóide de difteria (v.g., capítulo 3 da ref. 33], v.g., o mutante CRM197 [v.g., 34].
- Um antígeno de tétano, tal como um toxóide de tétano [v.g., capítulo 4 da ref. 33].
- Um antígeno de sacárido proveniente de *Haemophilus influenzae B* [v.g., 19].
- Um antígeno proveniente de *N. gonorrhoeae* [v.g., 3, 4, 5].
- Um antígeno proveniente de *Chlamydia pneumoniae* [v.g., 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41].
- Um antígeno proveniente de *Chlamydia trachomatis* [v.g., 42].
- Um antígeno proveniente de *Porphyromonas gingivalis* [v.g., 43].
- Antígenos de poliomielite [v.g., 44, 45], tais como IPV ou OPV.
- Antígeno(s) de raiva [v.g., 46] tais como vírus inativado liofilizado [v.g., 47, RabAvert™].
- Antígenos de sarampo, papeira e/ou rubéola [v.g., capítulos 9, 10 e 11 da ref. 33].
- Antígeno(s) de gripe [v.g., capítulo 19 da ref. 33], tais como hemaglutinina e/ou proteínas da superfície de neuraminidase.
- Um antígeno proveniente de *Moraxella catarrhalis* [v.g., 48].
- Um antígeno de proteína proveniente de *Streptococcus agalactiae* (grupo B de estreptococos) [v.g., 49, 50].
- Um antígeno de sacárido proveniente de *Streptococcus agalactiae*.

- Um antígeno proveniente de *Streptococcus pyogenes* (grupo A de estreptococos) [v.g., 50, 51, 52].
- Um antígeno de *Staphylococcus aureus* [v.g., 53].

A composição pode compreender um ou vários destes antígenos suplementares.

No caso de ser utilizado um antígeno de um sacárido ou de um hidrato de carbono, então é preferencialmente conjugado com uma proteína de transporte para aumentar a imunogenicidade [v.g., refs. 54 a 63]. Como proteínas de transporte preferenciais refere-se toxinas ou toxóides bacterianos, tais como toxóides de difteria ou do tétano. É particularmente preferido o toxóide de difteria CRM₁₉₇. Como outras proteínas de transporte adequadas refere-se a proteína da membrana exterior de *N. meningitidis* [v.g., ref. 64], péptidos sintéticos [v.g., 65, 66], proteínas resistentes ao calor [v.g., 67], proteínas *pertussis* [v.g., 68, 69], proteína D proveniente de *H. influenzae* [v.g., 70], toxina A ou B proveniente de *C. difficile* [v.g., 71], etc.. No caso de a mistura compreender sacáridos capsulares dos serogrupos A e C, então é preferível que a proporção (p/p) sacárido MenA:sacárido MenC seja superior a 1 (v.g., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10: ou superior). Os sacáridos de serogrupos diferentes de *N. meningitidis* podem ser conjugados nas mesmas proteínas de transporte ou num diferente.

É possível utilizar qualquer reacção de conjugação adequada, com qualquer sequência de ligação adequada se necessário.

Os antígenos de proteínas tóxicas podem ser desintoxicados se necessário (v.g., desintoxicação da toxina *pertussis* por meios químicos e/ou genéticos [32]).

No caso de um antígeno de difteria ser incluído na composição, então é preferível incluir também um antígeno de tétano ou um antígeno de pertussis. De igual modo, no caso de se incluir um antígeno de tétano, então é preferível incluir também os antígenos de difteria e de pertussis. De igual modo, no caso de se incluir um antígeno de pertussis, então é preferível incluir também os antígenos de difteria e de tétano.

Os antígenos são preferencialmente misturados com (ou mais preferencialmente adsorvidos num) sal de alumínio (v.g., fosfato, hidróxido, hidroxifosfato, oxi-hidróxido, ortofosfato, sulfato). O sal pode assumir qualquer forma (v.g., gel, cristalina, amorfa, etc.).

Tipicamente, os antígenos na composição irão estar presentes numa concentração pelo menos de 1 µg/mL cada. De um modo geral, a concentração de cada antígeno deverá ser suficiente para provocar uma resposta imune contra o antígeno.

Como alternativa à utilização de antígenos de proteínas na composição da invenção, é possível utilizar ácidos nucleicos que codifiquem o antígeno [v.g., refs. 72 a 80]. Os componentes proteicos das composições da invenção podem assim ser substituídos por ácidos nucleicos (de preferência ADN, v.g., na forma de um plasmídeo) que codifique a proteína.

Definições

O termo "compreender" designa "incluir", bem como "ser constituído", v.g., uma composição que "compreende" X pode ser constituída exclusivamente por X ou podem incluir outros componentes adicionais, v.g., X + Y.

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

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A figura 1 mostra um alinhamento de vinte e três sequências para a proteína 741. Estas representam as SEQ ID 1 a 22 mais a sequência proveniente de MC58.

A figura 2 mostra as proteínas híbridas e em série da invenção.

FORMAS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Proteínas híbridas - $X_1 = 961c$ ou $961cL$

Para além das descritas nas referências 1 e 2, foram construídas oito proteínas híbridas com 961c ou com 961cL (isto é, 961c + péptido líder) no terminal N:

nº	n	X_1	L_1	X_2	L_2
1	2	961c	-	287	-
2	2		-	287	(His) ₆
3	2		-	230	(His) ₆
4	2		-	936	(His) ₆
5	2	961cL	-	287	-
6	2		-	287	(His) ₆
7	2		-	230	(His) ₆
8	2		-	936	(His) ₆

Estas proteínas foram preparadas com adjuvante completo de Freund (FCA) ou com 3,3 mg/mL de hidróxido de alumínio (alum) e foram utilizadas para imunizar murganhos. O soro resultante foi testado contra diversas estirpes de

Neisseria utilizando um ensaio bactericida. Os títulos utilizando a proteína nº 8 foram os seguintes:

Estirpe ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Hidróxido de Al	8192	8192	512	1024	< 16
FCA	65536	16384	> 2048	> 2048	8192

Os títulos obtidos após imunização com 961c-741 [refs. 1 e 2] foram os seguintes:

Estirpe ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
Hidróxido de Al	65536	32768	4096	>32768	16384	>2048
FCA	>16384	262144	4096	>16384	–	>2048

Estes resultados podem ser melhorados através da mistura de 961c-741 com ORF46.1 ou com ΔG287-919.

Os resultados obtidos após imunização com as proteínas descritas nas refs. 1 e 2, testados contra a estirpe homóloga, foram os seguintes:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Título bactericida		ELISA	
					FCA	Alum	FCA	Alum
2	961c	–	ORF46.1	(His) ₆	32768	1024	>109350	>109350
			741		>16384	8192	>109350	>109350
			936		>32768	8192	>109350	>109350

Os resultados obtidos após imunização com as proteínas descritas nas refs. 1 e 2 foram os seguintes:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Título bactericida		ELISA	
					FCA	Alum	FCA	Alum
2	ORF46.1	–	961	(His) ₆	8192	8192	21558	>109350
		–	961c	(His) ₆	8192	128	9020	76545

Proteínas híbridas - $X_1 = 936$

Para além das descritas nas referências 1 e 2, foram construídas sete proteínas híbridas com 936 no terminal N:

nº	n	X_1	L_1	X_2	L_2
3	2	936	–	741 _{ET37}	(His) ₆
4	2		–	741 _{MC58}	(His) ₆
5	2		–	741 _{90/18311}	(His) ₆
6	2		–	741 _{95N477}	(His) ₆
7	2		–	741	(His) ₆

Estas proteínas foram preparadas com adjuvante completo de Freund (FCA) ou com 3,3 mg/mL de hidróxido de alumínio (alum) e foram utilizadas para imunizar murganhos. O soro resultante foi testado contra diversas estirpes de *Neisseria* utilizando um ensaio bactericida.

Estirpe ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Hidróxido de Al	16384	32768	1024	2048	<1,6
FCA	65536	65536	>2048	8192	2048 (36%)

Os títulos obtidos utilizando a proteína nº 4 foram os seguintes:

Estirpe ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Hidróxido de Al	256	>262144	>2048	32768	8192
FCA	1024	>262144	>2048	>32768	>32768

Os títulos obtidos utilizando a proteína nº 7 foram os seguintes:

Estirpe ^(serogrupo)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
Hidróxido de Al	256	130000	16000	32000	8000	16000

Os resultados obtidos após imunização com as proteínas descritas nas refs. 1 e 2, testados contra a estirpe homóloga, foram os seguintes:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Título bactericida		ELISA	
					FCA	Alum	FCA	Alum
2	936	-	741	(His) ₆	1024	256	1466	5715
			936		>32768	>32768	>109350	>109350

Misturas de proteínas híbridas

Efectuou-se a imunização de murganhos com três proteínas adjuvadas com hidróxido de alumínio, quer por si sós quer numa combinação tripla: (1) 287_{Nz}-953; (2) 936-741 e (3) 961c. A mistura permitiu induzir títulos bactericidas mais elevados contra diversas estirpes:

	2996^(B)	MC58^(B)	NGH38	394/98^(B)	H44/76^(B)	F6124^(A)	BZ133^(C)	C11^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000
Mist	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
(X)	4000	4000	1000	1000	>4000	1000	4000	n.d.
"-" significa que esta estirpe não contém o gene NadA (X) era uma combinação da proteína 287 com vesículas da membrana exterior, para comparação								

Tomando em consideração os murganhos individuais, a mistura induziu títulos bactericidas superiores e consistentes:

n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

nº	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	ΔG741 _{MC58}	–	741 _{MC58}	(His) ₆
2	2	ΔG287 ₂₉₉₆	(Gly) ₆	ΔG287 _{394/98}	(His) ₆
3	2	ΔG287 ₂₉₉₆	(Gly) ₆	ΔG287 ₂₉₉₆	(His) ₆
4	2	ΔG287 _{394/98}	(Gly) ₆	ΔG287 _{394/98}	(His) ₆
5	2	ΔG287 _{394/98}	(Gly) ₆	ΔG287 ₂₉₉₆	(His) ₆

Variantes alélicas – 741

Foram encontradas vinte e duas sequências polimórficas de 741 (SEQ ID 1 a 22). Na figura 1 estão alinhadas estas sequências e a sequência de MC58.

QUADRO 1

Estirpe	1343	Sequência	Classificação da estirpe
72/00	+		ET5 B:15:P1.7,13,13a
30/00	+		ET5 B:15:P1.7,16
39/99	+		ET5 C:15:P1.7,16
95330	+		ET5 B:4:P1.15
M4102	+		ET5 nd
MC58 (21)	+	+	ET5 B:15:P1.7,16b
BZ169 (7)	+	+	ET5 B:NT:P1.16
BZ83 (19)	+		ET5 B:15:–.–
CU385	+	+	ET5 B:4:P1.15
220173I	+		ETS NG:4:P1.15
64/96	+	+	ET5 NG:15:P1.7,16 (veículo)
220173I	+		ET5 B:4:P1.15 (veículo)
ISS1071	+		nd B:15:P1.7,16 (ET5?)
BZ198 (2)	+	+	lin.3 B:8:P1.1
980–2543	+	+	lin.3 B:NT:P1.4
16060	+	+	outro B:4:P1.14 (veículo)

Estirpe	1343	Sequência	Classificação da estirpe
394-98	+		nd B:4:P1.4 (lin 3?)
ISS1106	+		nd B:4:P1.4 (lin.3?)
BZ133 (10)	+	+	sub I B:NT:-.-
S3446	+	+	nd B:14:P1.23,14
ISS1001	+	+	ndB:14:P1.13
241175I	+		outro NG:21 :P1.16 (veículo)
171274I	+		outro NG:15:- (veículo)
66/96	+		outro B:17:P1.15 (veículo)
961-5945	-		A4
96217	-		A4
312294	-		A4
90/18311 (24)	-		ET37
93/4286 (25)	-		ET37
M986	-		ET37
1000 (5)	-		outro
NGE28 (13)	-		outro veículo
NGH38 (14)	-		outro veículo
BZ232 (18)	-		outro
F6124 (23)	-		sub III A:-.-
C11	-		C:-
NMB	-		nd
8047	-		nd
ISS759	-		nd C:2b:P1.2
ISS1113	-		nd C:2:P1.5
65/96	-		nd 4:P1.14
2996 (96)	-		nd B:2b:P1.5,2

REFERÊNCIAS (cujo conteúdo se considera aqui incorporado por referência)

- 1 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO01/64920.
- 2 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO01/64922.
- 3 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO99/24578.
- 4 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO99/36544.
- 5 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO99/57280.
- 6 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO00/22430.
- 7 - Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
- 8 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO00/66741.
- 9 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO00/71574.
- 10 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO01/04316
- 11 - Pedido de patente de invenção internacional n° PCT/IB02/03396.
- 12 - Comanducci et al. (2002) J Exp Med 195:1445-1454.
- 13 - Vaccine Design: subunit & adjuvant approach (1995) Powell & Newman (ISBN: 030644867X).
- 14 - Pedido de patente de invenção internacional n° WO01/52885.
- 15 - Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
- 16 - Fukasawa et al. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
- 17 - Rosenqvist et al. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333.

- 18 - Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698.
- 19 - Costantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- 20 - Pedido de patente de invenção internacional nº PCT/IB02/03191.
- 21 - Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
- 22 - Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.
- 23 - Jedrzejask (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
- 24 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO93/18150.
- 25 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO99/53310.
- 26 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO98/04702.
- 27 - Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
- 28 - Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
- 29 - Gerlich et al. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- 30 - Hsu et al. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915.
- 31 - Gustafsson et al. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- 32 - Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- 33 - Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- 34 - Del Guidice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
- 35 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO02/02606.
- 36 - Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
- 37 - Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
- 38 - Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181 (Supl.3): S524-S527.
- 39 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO99/27105.

- 40 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO00/27994.
- 41 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO00/37494.
- 42 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO99/28475.
- 43 - Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- 44 - Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- 45 - Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- 46 - Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
- 47 - MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16; 47(1): 12,19.
- 48 - McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl.I:S101-107.
- 49 - Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- 50 - WO02/34771.
- 51 - Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- 52 - Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- 53 - Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; ver também páginas 1218-1219.
- 54 - Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- 55 - Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl.2:S28-36.
- 56 - Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34: 163-168.
- 57 - Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 113-133, vii.
- 58 - Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- 59 - Patente europeia nº 0 477 508.
- 60 - Patente norte-americana nº 5 306 492.
- 61 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO98/42721.

- 62 - Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, em particular vol. 10: 48-114.
- 63 - Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 or 012342335X.
- 64 - Pedido de patente de invenção europeia nº 0372501.
- 65 - Pedido de patente de invenção europeia nº 0378881.
- 66 - Pedido de patente de invenção europeia nº 0427347.
- 67 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO93/17712.
- 68 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO98/58668.
- 69 - Pedido de patente de invenção europeia nº 0471177.
- 70 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO00/56360.
- 71 - Pedido de patente de invenção internacional nº WO00/61761.
- 72 - Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology 9:271-283.
- 73 - Donnelly et al. (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648.
- 74 - Scott-Taylor & Dalglish (2000) Expert Opin Investig Drugs 9:471-480.
- 75 - Apostolopoulos & Plebanski (2000) Curr Opin Mol Ther 2:441-447.
- 76 - Ilan (1999) Curr Opin Mol Ther 1:116-120.
- 77 - Dubensky et al. (2000) Mol Med 6:723-732.
- 78 - Robinson & Pertmer (2000) Adv Virus Res 55:1-74.
- 79 - Donnelly et al. (2000) Am J Respir Crit Care Med 162 (4 Parte 2): S190-193.
- 80 - Davis (1999) Mt. Sinai J. Med. 66:84-90.
- 81 - Parkhill et al. (2000) Nature 404:502-506.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID 1 - 741 da estirpe 1000

MTRSKPVNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTTPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLKNDKVSERFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEIKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 2 - 741 da estirpe 2201731 (codão de interrupção prematuro, embora sequência confiável)

MTRSKPVNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLKNDKVSERFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQNSAVVALQIEKIN
 DSEHSGKMSVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQGGNGKIEHLK
 SPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKA

SEQ ID 3 - 741 da estirpe 90/18311 (incompleta)

GLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLKNDKVSERFDFIRQIEV
 DGQLITLESGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAETHGK
 AFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEIKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLA
 LFGDRAQEIAGSATVKIREKVHET

SEQ ID 4 - 741 da estirpe L93/4286 (incompleta)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLKNDKVSERFDFIRQIEV
 DGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAETHGK
 AFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEIKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLA
 LFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 5 - 741 da estirpe 2996

MTRSKPVNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLKNDKVSERFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQNSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQGGNGKIEHLKT
 PEQNVELAAAEIKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 6 - 741 da estirpe 30/00

KDKGLQSLTLDQSVRKNEK LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLKNDKVSERFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
 QIYKQNSAVVALQIEKIN DSEHSGKMSVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
 YTYTIDFAAQGGNGKIEHLK SPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAG
 SAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 7 - 741 da estirpe 312294

MTRSKPVNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLNKDKVSRPFDIFRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQSRFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDAGCKLTYYTIDFAAQGGHKGIEHLKT
 PEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGERVHEIGIAGKQ

SEQ ID 8 - 741 da estirpe 39/99 (incompleta)

DKGLQSLTLDQSVRKNEK LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLNKDKVSRPFDIFRQIEVDGQLITLESSEGFQ
 VYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGCKLT
 YTTIDFAAQGGHKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGS
 AEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 9 - 741 da estirpe 5/99

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLNKDKVSRPFDIFRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQSRFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAETHGKAFSSDDPNGRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEGKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 10 - 741 da estirpe 67/00

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLNKDKVSRPFDIFRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
 DPEHSGKMVAKRRFXHIGDIAGEHTSFDKLPKQVMATYRGTAFGSDDAGCKLTYYTIDFAAQGGHKGIEHLK
 SPELNVELATAYIRPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVTANGIHIGLAAKQ

SEQ ID 11 - 741 da estirpe BZ169

LQSLTLDQSVRKNEK LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLNKDKVSRPFDIFRQIEVDGQLITLESSEGFQVYK
 QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGCKLTYYTI
 DFAAQGGHKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEV
 KTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 12 - 741 da estirpe 72/00

LQSLTLDQSVRKNEK LKLAQAQGAENTYNGDSLNTGKLNKDKVSRPFDIFRQIEVDGQLITLESSEGFQVYK
 QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGCKLTYYTI
 DFAAQGGHKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEV
 KTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 13 - 741 da estirpe 93/114

MTRSKPVNRTAFCCFLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEXTYGNQDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
 DPEHSGKMWAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLK
 SPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSLVYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGINHHIGLAAKQ

SEQ ID 14 - 741 da estirpe 95N477

MTRSKPVNRTAFCCFLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEXTYGNQDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYNQDHSADVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQSFVSLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVXIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 15 - 741 da estirpe 96217

MTRSKPVNRTAFCCFLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEXTYGNQDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYNQDHSADVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQSFVSLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLK
 PEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVXIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 16 - 741 da estirpe BZ133

MTRSKPVNRTAFCCFLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEXTYGNQDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
 DSEHSGKMWAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPDGGRTYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLK
 SPELNVDLAASDIKPKRRHAVISGSLVYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGIRHHIGLAAKQ

SEQ ID 17 - 741 da estirpe BZ232

MTRSKPVNRTAFCCFLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEXTYGNQDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQSFVSLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVXIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 18 - 741 da estirpe C11

MTRSKPVNRTAFCCFLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
 LKLAQAQGAEXTYGNQDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 NPDKIDSLINQSFVSLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAHEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVXIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 19 - 741 da estirpe M1090

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQOLITLESSEFQIVKQDHSAAVVALQIEKIN

NPKIDSLINQRSFLVSGLOGGENTAFNQLPSCGAETHGKAPSSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEENGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 20 - 741 da estirpe M1096

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
NPKIDSLINQRSFLVSGLOGGENTAFNQLPDGKAETHGKAPSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEENGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 21 - 741 da estirpe M198/172

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQOLITLESSEFQIVKQSHSALTALQTEQVQ
DSEHSGRMVAKRQFRIGDIAGENTSFDKLPCCGRATYRGTAFCSDDASGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLK
SPELNVDLAASDIKPKRRHAVISGSVLYNQAENGSGYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 22 - 741 da estirpe NGH38

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
NPKIDSLINQRSFLVSGLOGGENTAFNQLPDGKAETHGKAPSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEENGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 23 - NMB/343 proveniente de dez estirpes de meningococos

MGNFLYRGISCCQDQEQNGQLKPRGNKAEVAIRYDGRFKYDGRKATHGSPSVKNNAVYAHQIETGLYDGCYIS
TTTDKEIAKKFATSSGIENGYIYVLNRDLFGQYSIFEYEVERHPENPNEKEVTIRAEDCGCIPEEVIAKE
LIEIN

SEQ ID 24 - NMB/343 proveniente de gonococos

INNLWEISYLYRGISCCQDQEQNGQLKPRGNKAEVAIRYDGRFKYDGRKATHGSPSVKNNAVYAHQIETDLYD
GCYISTTTDKEIAKKFATSSGIENGYIYVLNRDLFGQYSIFEYEVERHPENPDEKEVTIRAEDCGCIPEEV
IAKELIEIN

**SEQ ID 25 - sequência de ácido nucleico de NMB/343
(gonococos)**

TCCGCCGCATTACCTTATAAAATAAAACATCCCTCTCAAGCAGTCTGATAATGTTTGGATTGCTTGASAT
TGATGAGTGTATGGTGTAAATTCAAACTTTAAATTAATAACTTATGGGAAATTTCTTATTTATATAGAGG
CATTAGTTGCCAACAAGATGAGCAAAATAATGGACAGTTAAAACCTAAAGGTAATAAAGCTGAAGTTGCA
ATTGCTTATGATCGGTAAGTTTAAATATGATGGTAAAGCTACACATGGTCCAAGTGTGAAGAATGCAGTTT
ACGCCCATCAAATTCAAACAGATCTATATGACGGATGTTATATATCTACGACAACAGACAAGGAAATTC
CAAGAAATTTGCAACAAGCTCCGGCATCGAAAATGGCTATATATATGTTTAAATAGAGATTGTTTGGT
CAATATTCTATTTTGAATATGAGGTTGAACATCCAGAAAACCCAGATGAGAAGGAAGTAACAATCAGAG
CTGAAGATTGTGCTGTATTCCTGAAGAAGTGATTATTGCTAAAGAGTTGATAGAAATTAAGTAAGTTGA
AAGGTCAATATAATGGCTTTAGTTGAATTGAAAGTGCCCGACATTGGCGGACACGAAAATGTAGATATTA
TCCG

**SEQ ID 26 - sequência de ácido nucleico de NMB/343
(menigococos)**

TCCGCCGCATTACCTTATAAAATAAAACATCCCTCTCAAGCAGTCTGATAATGTTTGGATTGCTTGAGAT
TGATGAGTAATGGTGTAAATTCAAACTTTAAATTAATAACTTATGGGAAATTTCTTATATAGAGGCATT
AGTTGCCAACAAGATGAGCAAAATAATGGACAGTTAAAACCTAAAGGTAATAAAGCTGAAGTTGCAATTC
GTTATGATGGTAACTTTAAATATGATGGTAAAGCTACACATGGTCCAAGTGTGAAGAATGCAGTTTACCC
CCATCAAATTGAAACAGCTCTATATGACGGATGTTATATATCTACGACAACAGACAAGGAAATTCGCAAG
AAATTTGCAACAAGTTCCGGCATCGAAAATGGCTATATATATGTTTAAATAGGCATTTGTTTGGTCAAT
ATTCTATTTTGAATATGAGGTTGAACATCCAGAAAACCCAAATGAGAAGGAAGTAACAATCAGAGCTGA
AGATTGTGGCTGTATTCCTGAAGAAGTGATTATTGCTAAAGAGTTGATAGAAATTAAGTAAGTTGAAAGG
TCAATATAATGGCTTTAGTTGAATTGAAAGTGCCCGACATTGGCGGACACGAAAATGTAGATATTATCCG

SEQ ID 27 - sequência de ligação

GSGGGG

SEQ ID 28 - híbrido ΔG287-953 preferido

MASPDVKSADTL5KPAAPVVAEKETEVEKEDAPQAGSQGQCAPSTGSSQDMAAVSAENTGNGGAATTDKPK
NEDEGPQNDMPQNSAESANQTCNNQPADSSDSA PASNPAPANGGENFGRVDLANGVLIDGPSQNTILTHC
KGDSCNGDNLLEDDEAPSKSEPENLNSESERIEKYKKDGKEDKFTNLVATAVQANGTNKYVIIYKDKSASSS
SARPRRSARSRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNRYRLTYCAEKLPGGSYALR
VQGEPAKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAANVDPGSKSVLDGIIDSGDDLHMGTQKFKAAI
DGNCFKGTWTENGCCDVSGRPYCPAGEEVACKYSYRPTDAEKGGFGVFACKKEQDSGQCCATYKVDEYH
ANARFAIDHFNSTSNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIFVANLQSGSQHFTDHLXSADIFDAAQYPD
IRFVSTKFNFNKGKLLVSVGNLTMHGXTAPVELKAEKFNCYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVLYLV
NVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID 29 - híbrido AG287_{NZ}-953

MASPDVKSADTLSPKPAAPVWSEKETEAKEDAPQAGSQGQCAPSAQCCQDMAAVSEENTGNGGAAATEKPK
 NEDEGAQNMDPQNAADTDSLTFNHTPASNNPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMAANTADGMQGGDPSAGG
 ENAGNTAAQGTNQAENNQTAGSQNPASSTNPSATNSGGDFGRTNVGNSVVIDGFSQNTLTHCKGDSGSG
 NNFLDEEVQLKSEFEKLSCADKISNVKKDGKNDGKNDKPFVGLVADSVQMKGINQYIIFVKPKPTSFARFR
 RSARSRRSLPAEMPLIPVNOADTLIVDGEAVSLTGHSQNI PAPEGNYRYLTYGAEXLPGGSYALRVQGEF
 SKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRRPSPSRGEFAAKVDGFGSKSVDCIIDSGDGLHMGTKKFAAIDGNCF
 KGTWTENGCGDVSGRFYGFAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQDGSQGGGATYKVDEYHANARF
 AIDHFNSTSNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHFTDHLKSADIPDAAQYPOIRFVS
 TKPFNFNGKKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAEXFNCYQSPMAKTEVCCGDFSTTIDRTKWCVDYLVNFGMT
 KSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID 30 - híbrido 936-AG741

MKKPKHTVRTLIAAIFSLALSGCVSAVIGSAAVGA SAVDRRTTGAQTDDNMALRIETTARSYLQNNQ
 TKGYTPQISVVGYNRHLLLLLQGVATEGEXQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSK
 VRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVMGILPFEEQAQITCKVSTTVGVQKVITLYQNYVQFGSGGGGVA
 ADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFDFI
 RQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSQKMAKRQFRIGDIAGENTSFDKLP EGGR
 ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKRIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQA EK
 GSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLA AKQ

SEQ ID 31 - 976c

MATNDDDVKKAAATVAIAAAVINGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTN
 LTKTVNENKONVDKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTF AEETKTNIV
 KIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTFANEAKQTAETKQNVDAKVRAAETAAGKAE
 AAAGTANTAADKAEVA AAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVYTREESDSKPFVRIDGLNATTEKLDTRL
 ASAEKSIADNDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 9957280 A [0005]
- WO 0056365 A [0041]
- WO 9014837 A [0044]
- WO 0007621 A [0044]
- WO 9944636 A [0044]
- GB 2220221 A [0044]
- EP 0689454 A [0044]
- EP 0835318 A [0044]
- EP 0735898 A [0044]
- EP 0761231 A [0044]
- WO 9602555 A [0044]
- WO 986247 A [0044]
- WO 9818810 A [0044]
- WO 9840100 A [0044]
- WO 9855495 A [0044]
- WO 9837919 A [0044]
- WO 9852581 A [0044]
- WO 9952549 A [0044]
- WO 0121207 A [0044]
- WO 0121152 A [0044]
- WO 0062800 A [0044]

- WO 0023105 A **[0044]**
- WO 9911241 A **[0044]**
- WO 9857659 A **[0044]**
- WO 0164920 A **[0072]**
- WO 0164922 A **[0072]**
- WO 9924578 A **[0072]**
- WO 9936544 A **[0072]**
- WO 0022430 A **[0072]**
- WO 0066741 A **[0072]**
- WO 0071574 A **[0072]**
- WO 0104316 A **[0072]**
- WO 0203396 W **[0072]**
- WO 0152885 A **[0072]**
- WO 0203191 W **[0072]**
- WO 9318150 A **[0072]**
- WO 9953310 A **[0072]**
- WO 9804702 A **[0072]**
- WO 0202606 A **[0072]**
- WO 9927105 A **[0072]**
- WO 0027994 A **[0072]**
- WO 0037494 A **[0072]**
- WO 9928475 A **[0072]**
- WO 0234771 A **[0072]**
- EP 0477508 A **[0072]**
- US 5306492 A **[0072]**
- WO 9842721 A **[0072]**
- EP 0372501 A **[0072]**
- EP 0378881 A **[0072]**
- EP 0427347 A **[0072]**
- WO 9317712 A **[0072]**
- WO 9858668 A **[0072]**

- EP 0471177 A [0072]
- WO 0056360 A [0072]
- WO 0061761 A [0072]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- **Krieg.** *Vaccine*, 2000, vol. 19, 618-622 [0044]
- **Krieg.** *Curr- opin Mol Ther*, 2001, vol. 3, 15-24 [0044]
- **Roman et al.** *Nat. Med.*, 1997, vol. 3, 849-854 [0044]
- **Weiner et al.** *PNAS USA*, 1997, vol. 94, 10833-10837 [0044]
- **Davis et al.** *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 870-876 [0044]
- **Chu et al.** *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, 1623-1631 [0044]
- **Lipford et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1997, vol. 27, 2340-2344 [0044]
- **Moldoveanu et al.** *Vaccine*, 1988, vol. 16, 1216-1224 [0044]
- **Krieg et al.** *Nature*, 1995, vol. 374, 546-549 [0044]
- **Klinman et al.** *PNAS USA*, 1995, vol. 93, 2879-2883 [0044]
- **Ballas et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 157, 1840-1845 [0044]
- **Cowdery et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 156, 4570-4575 [0044]
- **Halpern.** *Cell. Immunol.*, 1996, vol. 167, 72-78 [0044]
- **Yamamoto et al.** *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, vol. 79, 866-873 [0044]
- **Stacey et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 157, 2116-2122 [0044]
- **Messina et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 1759-1764 [0044]
- **Yi.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 157, 4918-4925 [0044]

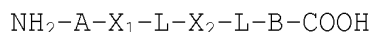
- **Yi et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 157, 5394-5402 [0044]
- **Yi et al.** *J. Immunol*, 1998, vol. 160, 4755-4761 [0044]
- **Yi et al.** *J. Immunol*, 1998, vol. 160, 5898-5906 [0044]
- **Tettelin et al.** *Science*, 2000, vol. 287, 1809-1815 [0072]
- **Comanducci et al.** *J Exp Med*, 2000, vol. 195, 1445-1454 [0072]
- **Powell; Newman.** *Vaccine Design: subunit & adjuvant approach*, 1995, ISBN 030644867X [0072]
- **Bjune et al.** *Lancet*, 1991, vol. 338 (8775), 1093-1096 [0072]
- **Fukasawa et al.** *Vaccine*, 1999, vol. 17, 2951-2958 [0072]
- **Rosenqvist et al.** *Dev. Biol. Stand.*, 1998, vol. 92, 323-333 [0072]
- **Costantino et al.** *Vaccine*, 1992, vol. 10, 691-698 [0072]
- **Costantino et al.** *Vaccine*, 1999, vol. 17, 1251-1263 [0072]
- **Watson.** *Pediatr Infect Dis J*, 2000, vol. 19, 331-332 [0072]
- **Rubin.** *Pediatr Clin North Am*, 2000, vol. 47, 269-285 [0072]
- **Jedrzejewski.** *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, vol. 65, 187-207 [0072]
- **Bell.** *Pediatr Infect Dis J*, 2000, vol. 19, 1187-1188 [0072]
- **Iwarson.** *APMIS*, 1995, vol. 103, 321-326 [0072]
- **Gerlich et al.** *Vaccine*, 1990, vol. 8, S63-S68 [0072]
- **Hsu et al.** *Clin Liver Dis*, 1999, vol. 3, 901-915 [0072]
- **Gustafsson et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1996, vol. 334, 349-355 [0072]
- **Rappuoli et al.** *TIBTECH*, 1991, vol. 9, 232-238 [0072]
- **Vaccines.** 1988 [0072]

- **Del Guidice et al.** *Molecular Aspects of Medicine*, 1998, vol. 19, 1-70 [0072]
- **Kalman et al.** *Nature Genetics*, 1999, vol. 21, 385-389 [0072]
- **Read et al.** *Nucleic Acids Res*, 2000, vol. 28, 1397-406 [0072]
- **Shirai et al.** *J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 181, S524-S527 [0072]
- **Ross et al.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 4135-4142 [0072]
- **Sutter et al.** *Pediatr Clin North Am*, 2000, vol. 47, 287-308 [0072]
- **Zimmerman; Spann.** *Am Fam Physician*, 1999, vol. 59, 113-118 125-126 [0072]
- **Dreesen.** *Vaccine*, 1997, vol. 15, S2-6 [0072]
- *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 16 January 1998, vol. 47 (1), 12, 19 [0072]
- **McMichael.** *Vaccine*, 2000, vol. 19, S101-107 [0072]
- **Schuchat.** *Lancet*, 1999, vol. 353 (9146), 51-6 [0072]
- **Dale.** *Infect Dis Clin North Am*, 1999, vol. 13, 227-43 [0072]
- **Ferretti et al.** *PNAS USA*, 2001, vol. 98, 4658-4663 [0072]
- **Kuroda et al.** *Lancet*, 2001, vol. 357 (9264), 1225-1240 [0072]
- *LANCET*, 1218-1219 [0072]
- **Ramsay et al.** *Lancet*, 2001, vol. 357 (9251), 195-196 [0072]
- **Lindberg.** *Vaccine*, 1999, vol. 17, S28-36 [0072]
- **Buttery; Moxon.** *J R Coll Physicians Lond*, 2000, vol. 34, 163-168 [0072]
- **Ahmad; Chapnick.** *Infect Dis Clin North Am*, 1999, vol. 13, 113-133 [0072]

- **Goldblatt.** *J. Med. Microbiol.*, 1998, vol. 47, 563-567
[0072]
- Conjugate Vaccines. vol. 10, 48-114 [0072]
- **Hermanson.** *Bioconjugate Techniques*, ISBN 0123423368
[0072]
- **Robinson; Torres.** *Seminars in Immunology*, 1997, vol. 9,
271-283 [0072]
- **Donnelly et al.** *Annu Rev Immunol*, 1997, vol. 15, 617-648
[0072]
- **Scott-Taylor; Dalglish.** *Expert Opin Investig Drugs*,
2000, vol. 9, 471-480 [0072]
- **Apostolopoulos; Plebanski.** *Curr Opin Mol Ther*, 2000, vol.
2, 441-447 [0072]
- **Ilan.** *Curr Opin Mol Ther*, 1999, vol. 1, 116-120 [0072]
- **Dubensky et al.** *Mol Med*, 2000, vol. 6, 723-732 [0072]
- **Robinson; Pertmer.** *Adv Virus Res*, 2000, vol. 55, 1-74
[0072]
- **Donnelly et al.** *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, vol.
162, S190-193 [0072]
- **Davis.** *Mt. Sinai J. Med.*, 1999, vol. 66, 84-90 [0072]
- **Parkhill et al.** *Nature*, 2000, vol. 404, 502-506 [0072]

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína híbrida que satisfaz a fórmula geral



em que cada símbolo L representa uma sequência de aminoácido de ligação facultativa, o símbolo A representa uma sequência de aminoácido facultativa do terminal N, o símbolo B representa uma sequência de aminoácido facultativa do terminal C,

(i) o símbolo X_1 representa

(a) a sequência de 936 aminoácidos de *N. meningitidis* (SEQ ID 2884 de WO 99/57280)

```

1  MKRPRTVPT LIAATPSIAL EOCVSAVIGS AAVGKSAVS SPTTCAQTDG
51  NVKALRIETT ARSYLQNNQ TNGYTPQISV VGYNNLLLL QVATEGEHQ
101  FVGGIARSEQ AAEGVNYIT VASLPRTAGQ IAGDTWYTK VBATLLGISF
151  ATQARVPIVT YGNVTYVMSI LTPPEAQIT QNVSTVGVQ NVITLYQNTV
201  QG.

```

ou

(b) uma sequência de aminoácidos com uma identidade de sequência de 90% ou superior à sequência de aminoácidos de (a) e

(ii) o símbolo X_2 representa

(a) a sequência de 741 aminoácidos de *N. meningitidis* (SEQ ID 2536 de WO 99/57280)

```

1  VQRTACCLE LTTALITAE ESQGGVAAQ ICAGLADALT AFLQHNDRGK
51  QSTLQQSVH NNEKRLAAQ GAEKTYGNGQ SINTGRLNNO KVSAPDFIRQ
101  IETVQKLTN ESSEFQVYKQ SHSALTAFQT EQIQSEHNG KVVANRQFRI
151  GQIAGERTSF DKLPEGRAT YRGTAPGSDN AGGRITYTID FAKQONGKI
201  EHLKSPFLNV DLAAADIKPE GRRAVIGQS VLYNQAEKGS YSLGIFGGKA
251  QEVAGSAEVK TVNGIRHIGL AANQ.

```

(b) uma sequência de aminoácidos que compreende a sequência de (a) com uma supressão no terminal N até e incluindo o resíduo 26 ou

(c) uma sequência de aminoácidos com uma identidade de sequência de 90% ou superior à sequência de aminoácidos de (a) ou (b).

2. Proteína híbrida de acordo com a reivindicação 1, em que o X_1 é 936 da estirpe 2996 e

(a) possui a sequência

```

1  MKFRHTVET LIAALFSLAL SGCYSAVIGS AAVEANSAVD RRTTGAQTED
91  NVMALRIETT ARSVLRQNHQ TEGTTFQISV VQYDRAHLLL QVATEGEMQ
101 FVGQIASSSQ AAGGVNMYIT VASLEPTAGD IAGDTWNTSK VBATLLGISQ
251 ATRARVXIVT YGNVTYVNGI LTFEEQAQIT QKVTTFVGVQ KVITLYQXVY
261 QK

```

(b) uma sequência de aminoácidos com uma identidade de sequência de 90% ou superior à sequência de aminoácidos de (a).

3. Proteína híbrida de acordo com a reivindicação 1, em que X_2

(a) possui uma sequência seleccionada entre uma das SEQ ID 1 a 22 (aqui descritas); ou

(b) uma sequência de aminoácidos com uma identidade de sequência de 90% ou superior à sequência de aminoácidos de (a).

4. Proteína híbrida de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, em que L possui 20 aminoácidos ou menos.

5. Proteína híbrida de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, em que L é uma sequência de ligação poli-glicina.

6. Proteína híbrida de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5, em que L possui a sequência de aminoácidos GSGGGG.

7. Proteína híbrida de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, em que A possui 40 aminoácidos ou menos.

8. Proteína híbrida de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7, em que B possui 40 aminoácidos ou menos.

9. Proteína híbrida de acordo com a reivindicação 1 que possui a sequência descrita na SEQ ID 30.

10. Ácido nucleico que codifica a proteína de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9.

11. Composição que compreende a proteína de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores e uma ou várias das proteínas seguintes:

(1) proteína de *Neisseria* 287

(2) proteína de *Neisseria* 741

(3) proteína de *Neisseria* ORF46.1

(4) proteína de *Neisseria* 961

(5) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $\text{X}_1 =$ proteína de *Neisseria* 287, $\text{X}_2 =$ proteína de *Neisseria* 953

(6) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $\text{X}_1 =$ proteína de *Neisseria* 287, $\text{X}_2 =$ proteína de *Neisseria* 919

(7) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $\text{X}_1 =$ proteína de *Neisseria* 287, $\text{X}_2 =$ proteína de *Neisseria* 961

(8) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, em que $n = 2$, $\text{X}_1 =$ proteína de *Neisseria* 287, $\text{X}_2 =$ proteína de *Neisseria* 741.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, que compreende as proteínas (4) e (5).

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, em que a proteína (4) compreende a SEQ ID 31 e a proteína (5) compreende a SEQ ID 28 ou a SEQ ID 29.

14. Composição de acordo com uma qualquer das reivindicações 11 a 13, a qual compreende ainda:

- um antígeno de proteína proveniente de *N. meningitidis*;

- uma preparação de vesícula de membrana exterior (OMV) proveniente de *N. meningitidis*;

- um antígeno de sacárido proveniente de *N. meningitidis*;

- um antígeno de sacárido proveniente de *Streptococcus pneumoniae*;

- um antígeno proveniente do vírus de hepatite A, B ou C;

- um antígeno proveniente de *Bordetella pertussis*;

- um antígeno de difteria;

- um antígeno de tétano;

- um antígeno de proteína proveniente de *Helicobacter pylori*;

- um antígeno de sacárido proveniente de *Haemophilus influenzae*;

- um antígeno proveniente de *N. gonorrhoeae*;

- um antígeno proveniente de *Chlamydia pneumoniae*;

- um antígeno proveniente de *Chlamydia trachomatis*;

- um antígeno proveniente de *Porphyromonas gingivalis*;

- antígeno(s) de poliomielite;

- antigénio(s) de raiva;
- antigénios de sarampo, papeira e/ou rubéola;
- antigénio(s) de gripe;
- um antigénio proveniente de *Moraxella catarrhalis*;
- um antigénio proveniente de *Streptococcus agalactiae*;
- um antigénio proveniente de *Streptococcus pyogenes*
e/ou
- um antigénio proveniente de *Staphylococcus aureus*.

15. Composição de acordo com uma qualquer das reivindicações 11 a 14, a qual compreende ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

16. Composição de acordo com a reivindicação 15, utilizável como medicamento.

17. Utilização de uma composição de acordo com a reivindicação 15 para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença provocada por *Neisseria*.

18. Composição de acordo com a reivindicação 15 para utilização no tratamento de uma doença provocada por *Neisseria*.

19. Utilização de acordo com a reivindicação 17 ou a composição de acordo com a reivindicação 18, em que a referida doença é a meningite bacteriana.

FIGURA 1

```

      .10      .20      .30      .40      .50
312294  1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
96      1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
96217  1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
M1096  1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
95N477 1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
C11    1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
599    1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
24     1: -----ADALIAAPL 11
1000   1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
M1096  1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
BZ232  1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
NGH38  1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
25     1: -----VADICAGADALIAAPL 18
6700   1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
93114  1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
21     1: -----MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 44
3999   -----
3000   -----
7       -----
7200   -----
M198172 1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
BZ133   1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50
2201731 1: MTRSRPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADICAGADALIAAPL 50

      .60      .70      .80      .90      100
312294  51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
96      1: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 49
96217  51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
M1096  51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
95N477 51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
C11    51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
599    51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
24     12: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 61
1000   51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
M1096  51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
BZ232  51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
NGH38  51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
25     19: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 68
6700   51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
93114  51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
21     45: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 94
3999   1: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 48
3000   1: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 49
7       1: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 45
7200   1: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 45
M198172 51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
BZ133   51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100
2201731 51: HKDKSLQSLTLDDQSVRKNEKLKLAAGGAERTYGNQDGLNTGKLNDRVSR 100

```

FIGURA 1 (CONT.)

```

      110      120      130      140      150
312294 101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
96      50: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN: 99
96217  101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
M1090  101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
95N477 101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
C11     101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
599     101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
24      62: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:111
1000    101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
M1096  101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
BZ232  101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
NGH38  101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
25      69: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:118
6700    101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
93114   101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
21      95: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:144
3999    49: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN: 98
3000    50: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN: 99
7        46: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN: 95
7200    46: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN: 95
M198172 101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
BZ133   101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150
2201731 101: FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQHYKQHSAMVALQIEK MM DKIDSLIN:150

      160      170      180      190      200
312294 151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
96      100: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:148
96217  151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
M1090  151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
95N477 151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
C11     151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
599     151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
24      112: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:160
1000    151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
M1096  151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
BZ232  151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
NGH38  151: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:199
25      119: QSSFLVSGLGGEHTAPNQLP KAETHGNAPSSDDAGGLTYTIDFAAK:167
6700    151: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:200
93114   151: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:200
21      145: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:194
3999    99: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:148
3000    100: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:149
7        96: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:145
7200    96: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:145
M198172 151: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:200
BZ133   151: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:200
2201731 151: KQSRIGDIAGENTSDDKLPKQVMTYRGTAFGSDDAGGLTYTIDFAAK:200

```

FIGURA 1 (CONT.)

```

      . . . 210 . . . 220 . . . 230 . . . 240 . . . 250
312294 200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
96      149: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:198
96217 200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
M1090 200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
95N477 200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
C11    200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
599    200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
24     161: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:210
1000   200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
M1096 200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
B2232 200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
NGH38 200: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:249
25     168: QGSGKIEHLKTPQNVLAS ELKADENSHAVILGOTRYGSEKGTIHLA:217
6700  201: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:250
93114 201: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:250
21     195: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:244
3999   149: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:198
3000   150: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:199
7       146: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:195
7200   146: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:195
M198172 201: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:250
B2133  201: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:250
2201731 201: QGSGKIEHLKSPENVLAS DIMPENRHAVISGSVLNQAEKGSYSLG:250

      . . . 260 . . . 270 . . . 280
312294 250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
96      199: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :212
96217 250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
M1090 250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
95N477 250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
C11    250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
599    250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
24     211: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :234
1000   250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
M1096 250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
B2232 250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
NGH38 250: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :279
25     218: LFGDRAQDAGSATVIREKVEEITG  :247
6700  251: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:280
93114 251: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:280
21     249: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:274
3999   199: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:228
3000   200: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:229
7       196: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:225
7200   196: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:225
M198172 251: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:280
B2133  251: IFGGQADVAGSAE ETANGIRHALLAAG:280
2201731 251: IFGGK-----:256

```

FIGURA 2

936-741_{MC38}-His

936-741_{ET37}-His