

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0619024-3 A2**

(22) Data de Depósito: 27/11/2006  
(43) Data da Publicação: 20/09/2011  
(RPI 2124)



(51) *Int.Cl.:*  
C12N 15/62  
C07K 14/22

(54) **Título:** POLIPEPTÍDEOS QUIMÉRICOS,  
HÍBRIDOS E TANDEM DE NMB1870  
MENINGOCÓCICO

(30) **Prioridade Unionista:** 25/11/2005 GB 0524066.8

(73) **Titular(es):** Novartis Vaccines and Diagnostics, SRL

(72) **Inventor(es):** Maria Scarselli, Mariagrazia Pizza, Marzia  
Giuliani, Rino Rappuoli, Vega Massignani

(74) **Procurador(es):** Orlando de Souza

(86) **Pedido Internacional:** PCT IB2006003876 de 27/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/060548de  
31/05/2007

(57) **Resumo:** QUIMÉRICOS, HÍBRIDOS E TANDEM DE MENINGOCÓCICO. NMB 1870 é uma proteína em *Neisseria meningitidis*. Três famílias de NMB 1870 são conhecidas. Para aumentar a capacidade de uma proteína NMB 1870 de despertar anticorpos que são reativos de forma cruzada entre as famílias, NMB 1870 é construído. Sequências podem ser substituídas de uma família de NMB 1870 na posição correspondente em uma outra família. Proteínas das seqüências de NMB 1870 de diferentes famílias podem ser ligadas umas às outras.

**POLIPEPTÍDEOS QUIMÉRICOS, HÍBRIDOS E TANDEM DE NMB1870  
MENINGOCÓCICO**

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

**5 Campo técnico**

Esta invenção está no campo de imunização e, em particular, imunização contra doenças causadas por bactérias patogênicas no gênero *Neisseria*, como *N. meningitidis* (meningococo).

**10 Técnica de fundamento**

*Neisseria meningitidis* é uma bactéria encapsulada Gram-negativa que coloniza o trato respiratório superior de aproximadamente 10% da população humana. Embora vacinas de polissacarídeos e conjugadas sejam disponíveis contra sorogrupos A, C, W135 e Y, essa abordagem não pode ser aplicada a sorogrupo B, uma vez que o polissacarídeo capsular é um polímero de ácido poli-siálico, que é um antígeno self em humanos. Para desenvolver uma vacina contra sorogrupo B, proteínas expostas na superfície contidas em vesículas de membrana externa (OMVs) foram usadas. Essas vacinas despertam respostas de anticorpo bactericida sérico e protegem contra doença, mas elas não induzem proteção de cepa cruzada [1]. Alguns profissionais têm seu foco atualmente em antígenos específicos meningocócicos para uso em vacinas [2].

Tal antígeno é "NMB1870". Essa proteína foi originalmente revelada como proteína '741' da cepa MC58 [Ids. de Seq. 2535 & 2536 na ref. 3; Id. de Seq. 1 nesta especificação], e foi também referida como 'GNA1870' [refs. 4-6, após ref. 2] e como "ORF2086" [7-9]. Essa lipoproteína

é expressa em todos os sorogrupos meningocócicos e foi encontrada em múltiplas cepas meningocócicas. Seqüências de NMB 1870 foram agrupadas em três famílias (aqui referidas como famílias I, II & III), e constatou-se que soro que surge contra uma dada família é bactericida na mesma família, mas não é ativo contra cepas que expressam uma das outras duas famílias, ou seja, há uma proteção cruzada intra-famílias, mas não proteção cruzada inter-famílias.

Para atingir proteção cruzada de cepa com o uso de NMB1870, portanto, é usada mais de uma família. Para evitar a necessidade de expressar e purificar proteínas separadas, foi proposta a expressão de diferentes famílias como proteínas híbridas [10-12], incluindo duas ou três das famílias em uma cadeia de polipeptídeo único. Vários híbridos foram testados e encorajaram a eficácia anti-meningocócica.

É um objetivo da invenção o fornecimento de abordagens melhoradas para sobrepor a especificidade de proteção de família gerada por NMB1870, e o uso dessas abordagens para fornecer imunidade contra doença e/ou infecção meningocócica, particularmente para sorogrupo B.

#### **Revelação da invenção**

Complementando o trabalho descrito na referência 13, os inventores substituíram seqüências de uma família NMB 1870 na posição correspondente em uma outra família, com o objetivo de produzir um NMB 1870 quimérico que não tem a especificidade de família dos polipeptídeos de tipo selvagem.

Como uma alternativa à construção de um NMB1870 único de modo que ele tenha características de todas as três

famílias, os inventores também produziram novos polipeptídeos híbridos e tandem que incluem seqüências de NMB 1870 de múltiplas famílias, assim complementando o trabalho descrito nas referências 10 e 12.

5 Enquanto cada família de NMB 1870 individual pode despertar anticorpos (por exemplo, em camundongos) que são eficazes apenas contra cepas na mesma família de NMB1870, os polipeptídeos quiméricos, híbridos e tandem da invenção podem despertar anticorpos que reconhecem polipeptídeos NMB  
10 1870 de mais de uma família.

Os inventores também identificaram várias novas formas polimórficas de NMB 1870, que incluem seqüências distintas das três famílias previamente relatadas (família IV).

#### **Substituições da família NMB1870**

15 A Referência 13 revela a substituição de seqüências de uma família NMB1870 em uma outra estrutura de NMB1870, para gerar polipeptídeos quiméricos NM131870. Os inventores realizaram trabalho adicional em quimeras e identificaram inúmeros resíduos chave para a substituição na seqüência da  
20 família NMB1870. A substituição desses resíduos pode melhorar a capacidade do polipeptídeo de despertar anticorpos que reagem de forma cruzada com os polipeptídeos da família II.

Portanto, a invenção fornece um polipeptídeo que  
25 compreende uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade ao Id. de Seq. N°:57, e em que um ou mais dos seguintes resíduos é substituído com um outro aminoácido ou é apagado: F14; T16; Q18; Q20; D21; S22; E23; H24; S25; G26; K27; K31; Q33; R35; I36; G37; I39; K48; E51;  
30 G52; R54; T56; A67; G68; K70; T72; A78; A79; N83; K85; D97;

D102; P105; G107; R109; S114; S116; L118; N120; Q121; A122; K135; T147; V148; N149; G150; I151; R152; H153.

É preferível que pelo menos um dos seguintes resíduos seja substituído: F14; T16; Q18; K31; Q33; R35; 136; G37; 5 139; T56; K70; T72; A78; A79; K85; D97; D102; S114; S116; L118; K135. Nenhum desses resíduos foi selecionado para substituição na referência 13.

Aminoácidos preferidos para substituição ou deleção são: F14; T16; Q18; Q20; D21; S22; E23; H24; S25; G26; K27; 10 K31; Q33; R35; 136; G37; K48; E51; 052; R54; T72; A79; K85; P105; G107; R109; L118; N120; Q121; A122; T147; V148; N149; G150; I151; R152; H153. Substituição de resíduos é preferida, exceto por E51, em que a deleção é preferida.

Resíduos são preferivelmente Substituídos com o 15 aminoácido correspondente de NMB1870 na família II ou família III. Substituições preferidas são, portanto: F14L; T16I; Q18K; Q20N; D21N; S22P; E23D; H24K; S25I; S25T; G26D; K27S; K31Q; Q33S; R35L; I36V; G37S; I39L; K48Q; G52D; R54K; T56E; A67P; G68N; K70R; T72H; A78T; A79K; N83H; N83Y; K85R; 20 D97E; D102E; P105A; G107E; R109S; S114L; S116D; L118R; N120G; Q121S; A122E; K135R; T147I; V148G; N149E; G150K; I151V; R152H; H153E. Apenas os resíduos 25 e 83 nessa lista têm mais de uma substituição preferida, uma vez que todos os outros têm o mesmo aminoácido em duas das famílias I, II 25 e III.

A seqüência de aminoácidos tem pelo menos 70% de identidade ao Id. de Seq. N°:57, por exemplo,  $\geq 75\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 85\%$ ,  $\geq 90\%$ ,  $\geq 95\%$ ,  $\geq 96\%$ ,  $\geq 97\%$ ,  $\geq 98\%$ ,  $\geq 99\%$  ou mais. Essa seqüência pode estar presente como parte de um polipeptídeo 30 maior.

O polipeptídeo pode ter a capacidade de induzir anticorpos bactericidas anti-meningocócicos após administração a um animal hospedeiro, e em modalidades preferidas pode induzir anticorpos que são bactericidas 5 contra cepas em cada uma das três famílias de NMB1870 I a III. Informação adicional sobre respostas bactericidas é dada abaixo.

Uma seqüência de aminoácidos preferida é Id. de Seq. N°:58 que, comparada a Id. de Seq. N°: 57, tem 10 substituições em: F14; T16; Q18; Q20; D21; S22; E23; H24; S25; G26; K27; K31; Q33; R35; 136; G37; K48; G52; R54; T72; A79; N83; K85; P105; G107; R109; L118; N120; Q121; A122; T147; V148; N149; G150; I151; R152; H153. Resíduo E51 foi deletado.

15 Uma outra seqüência substituída é Id. de Seq. N°:59. Uma outra seqüência substituída é Id. de Seq. N°:60.

#### Alças de superfície para substituição

Alças de superfície de Id. de Seq. N°: 1 foram identificadas como: (1) aminoácidos 164-168; (2) 20 aminoácidos 179-182; (3) aminoácidos 188-196; (4) aminoácidos 203-208; (5) aminoácidos 216-224; (6) aminoácidos 233-237; (7) aminoácidos 247-251; e (8) aminoácidos 262-263:

25 MNRTAFCCLSLTTALILLTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLL  
LAAQGAERTYNGDSLNTGKLNKDKVSRFDPIRQIEVDGQLITLESCEFQVYKQSHSALTAFQTEQ  
IQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLP~~EGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT~~YTI~~DFAAKQ~~NG  
KIEHLK~~SPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYS~~LGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNG  
IRHIGLAAKQ

Por alinhamento de Id. de Seq. N°: 1 com qualquer outra seqüência de NMB1870, a pessoa habilitada pode 30 identificar as posições das alças (1) a (8) naquela

seqüência. Para facilidade de referência, no entanto, as coordenadas de uma alça são aqui definidas como um fio de aminoácido(s) em uma seqüência de NMB1870 que, quando alinhado ao Id. de Seq. N°: 1 usando um algoritmo de alinhamento em pares, inicia com o aminoácido alinhado ao primeiro resíduo de aminoácido da alça acima definido no Id. de Seq. N°: 1 e termina com o último aminoácido da alça acima definido no Id. de Seq. N°: 1.

A substituição de seqüências de alça de uma família na posição de alça em uma outra família permite que NMB1870 quimérico seja produzido com antigenicidade de multifamília.

Portanto, a invenção fornece um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos modificada de uma primeira família de NMB1870, em que a seqüência modificada inclui pelo menos uma (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7) seqüência de alça de superfície de uma segunda família de NMB1870 no lugar de uma seqüência de alça de superfície da primeira família.

A invenção também fornece um polipeptídeo que compreende uma seqüência de estrutura em nove partes, com oito inserções de alça (uma entre cada parte consecutiva da seqüência de estrutura), em que pelo menos uma das seqüências de alça é tomada da seqüência de NMB1870 que é de uma diferente família de NMB1870 da seqüência de estrutura. É preferível usar alças de superfície de mais de uma diferente seqüência de NMB1870, e é possível inserir essas alças em uma única seqüência de estrutura. Portanto, a invenção fornece um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos:

~~B<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-B<sub>3</sub>-L<sub>3</sub>-B<sub>4</sub>-L<sub>4</sub>-B<sub>5</sub>-L<sub>5</sub>-B<sub>6</sub>-L<sub>6</sub>-B<sub>7</sub>-L<sub>7</sub>-B<sub>8</sub>-L<sub>8</sub>-B<sub>9</sub>~~

em que:

(a) cada um dos referidos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>,  
 5 B<sub>8</sub> e B<sub>9</sub> é: (i) um fragmento de Id. de Seq. N°: M; ou (ii)  
 uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos m% de  
 identidade de seqüência ao referido fragmento de (i) e/ou  
 que compreende um fragmento de pelo menos d aminoácidos  
 contíguos do referido fragmento de (i);

10 (b) cada um dos referidos L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub> e  
 L<sub>8</sub> é: (i) um fragmento de Id. de Seq. N°: 1, Id. de Seq.  
 N°: 2 e/ou de Id. de Seq. N°: 3; ou (ii) uma seqüência de  
 aminoácidos que tem pelo menos n% de identidade de  
 seqüência ao referido fragmento de (i) e/ou que compreende  
 15 um fragmento de pelo menos e aminoácidos contíguos do  
 referido fragmento de (i),

desde que pelo menos um dos referidos L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>,  
 L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub> e L<sub>8</sub> não seja um fragmento de Id. de Seq. N°: M.

A invenção também fornece um fragmento do referido  
 20 polipeptídeo, desde que o fragmento inclua pelo menos um de  
 L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub> e/ou L<sub>8</sub> e pelo menos um aminoácido  
 de dois ou mais de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>8</sub> e/ou B<sub>9</sub>.  
 Portanto, em algumas modalidades, o menor fragmento inclui  
 uma alça, um aminoácido para o terminal N daquela alça, e  
 25 um aminoácido para o terminal C daquela alça.

O valor de M é selecionado de 1, 2 ou 3, e as  
 definições de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>8</sub> e B<sub>9</sub> e de L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>,  
 L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub> e L<sub>8</sub> variam dependendo do valor de M.

O significado de "(i) um fragmento de Id. de Seq. N°:  
 30 M" é como se segue:



Coordenadas de Aminoácido em Id. de Seq. N°: <i>M</i>									
<i>M</i>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	B <sub>9</sub>
1	1-163	169-178	183-187	197-202	209-215	225-232	238-246	252-261	264-274
2	1-163	168-177	182-186	196-201	208-214	224-231	237-245	251-260	263-273
3	1-171	176-185	190-194	204-209	216-222	232-239	245-253	259-268	271-281

De modo similar, "(iii) um fragmento de Id. de Seq. N°: 1, Id. de Seq. N°: 2 e/ou de Id. de Seq. N°: 3" é definido como:

Coordenadas de Aminoácido em Id. de Seq. N°: 1, 2 ou 3								
<i>SEQ</i>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>	L <sub>6</sub>	L <sub>7</sub>	L <sub>8</sub>
1	164-168	179-182	188-196	203-208	216-224	233-237	247-251	262-263
2	164-167	178-181	187-195	202-207	215-223	232-236	246-250	261-262
3	172-175	186-189	195-203	210-215	223-231	240-244	254-258	269-270

Por exemplo, a invenção fornece um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos:

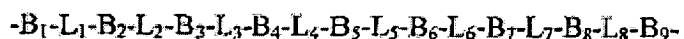


Em que: B<sub>1</sub> é aminoácidos 1-163 de Id. de Seq. N°: 1, ou uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos *m*% de identidade de seqüência aos referidos aminoácidos 1-163 e/ou que compreende um fragmento de pelo menos *d* aminoácidos contíguos dos referidos aminoácidos 1-163; B<sub>2</sub> é aminoácidos 169-178 de Id. de Seq. N°: 1, ou uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos *m*% de identidade de seqüência aos referidos aminoácidos 169-178 e/ou que compreende um fragmento de pelo menos *d* aminoácidos contíguos dos referidos aminoácidos 169-178; B<sub>9</sub> é aminoácidos 264-274 de Id. de Seq. N°: 1, ou uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos *m*% de identidade de seqüência aos referidos aminoácidos 264-274 e/ou que compreende um fragmento de pelo menos *d* aminoácidos contíguos dos referidos aminoácidos 264-274; L<sub>1</sub> é

aminoácidos 164-168 de Id. de Seq. N°: 2, ou uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos  $n\%$  de identidade de seqüência aos referidos aminoácidos 164-168 e/ou que compreende um fragmento de pelo menos  $e$  aminoácidos  
 5 contíguos dos referidos aminoácidos 164-168;  $L_2$  é aminoácidos 179-182 de Id. de Seq. N°: 2, ou uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos  $n\%$  de identidade de seqüência aos referidos aminoácidos 179-182 e/ou que compreende um fragmento de pelo menos  $e$  aminoácidos  
 10 contíguos dos referidos aminoácidos 179-182;  $L_7$  é aminoácidos 269-270 de Id. de Seq. N°: 3, ou uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos  $n\%$  de identidade de seqüência aos referidos aminoácidos 269-270 e/ou que compreende um fragmento de pelo menos  $e$  aminoácidos  
 15 contíguos dos referidos aminoácidos 269-270 etc.

O valor de  $m$  é selecionado de 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 ou mais. O valor de  $n$  é selecionado de 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 ou mais. O valor de  $d$  é  
 20 selecionado de 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 75, 100 ou mais. O valor de  $e$  é selecionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. O valor de  $e$  é preferivelmente menos que 20.

A invenção também fornece um polipeptídeo que  
 25 compreende a seqüência de aminoácidos quimérica:



como acima definido, e que também compreende N-terminal ou C-terminal à referida seqüência quimérica, uma seqüência de NMB1870, em que a referida seqüência de  
 30 NMB1870 está na mesma família de NMB1870 que Id. de Seq.

N°: M. Portanto, o polipeptídeo compreende tanto (i) NMB1870 de uma família particular quanto (ii) também NMB1870 da mesma família, mas com pelo menos uma de suas alças de superfície substituída por uma diferente família  
5 de NMB 1870.

A invenção fornece um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que tem um total de identidade de seqüência ao Id. de Seq. N°: Q de  $q\%$ , em que o valor de  $q$  é pelo menos  $r$ ; a identidade de seqüência da referida  
10 seqüência de aminoácidos ao Id. de Seq. N°: Q é de mais que  $q\%$  nas regiões de estrutura de Id. de Seq. N°: Q; e a identidade de seqüência da referida seqüência de aminoácidos ao Id. de Seq. N°: Q é menos que  $q\%$  nas regiões de alça de Id. de Seq. N°: Q. O valor de  $r$  é selecionado de  
15 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e 99,5.

O valor de Q é 1, 2 ou 3, e os limites das regiões de alça das regiões de estrutura são selecionados assim das tabelas acima ( $L_1$  a  $L_8$  sendo as alças, e  $B_1$  a  $B_9$  sendo a  
20 estrutura).

Quando Q é 1, a seqüência de aminoácidos em uma região de alça pode ter mais de  $q\%$  de identidade de seqüência à região de alça correspondente de Id. de Seq. N°: 2 ou Id. de Seq. N°: 3. Quando Q é 2, a seqüência de aminoácidos em  
25 uma região de alça pode ter mais de  $q\%$  de identidade de seqüência à região de alça correspondente de Id. de Seq. N°: 1 ou Id. de Seq. N°: 3. Quando Q é 3, a seqüência de aminoácidos em uma região de alça pode ter mais de  $q\%$  de identidade de seqüência à região de alça correspondente de  
30 Id. de Seq. N°: 1 ou Id. de Seq. N°: 2.

### Polipeptídeos híbridos e tandem

As referências 10 a 13 revelam polipeptídeos híbridos em que uma cadeia única de polipeptídeo inclui uma seqüência de NMB1870 e uma diferente seqüência de polipeptídeos meningocócicos. Por exemplo, híbridos contendo NMB 1870 e NadA são revelados na referência 10. A referência 12 revela um subconjunto específico de polipeptídeos híbridos, referidos como polipeptídeos tandem, em que uma cadeia única de polipeptídeo inclui múltiplas seqüências de NMB1870, por exemplo, um de cada família. A invenção fornece inúmeros novos polipeptídeos híbridos e tandem.

Em geral, um polipeptídeo híbrido pode ser representado pela fórmula:



Em que X é uma seqüência de aminoácidos que compreende uma seqüência de Neisseria, L é uma seqüência de aminoácidos de ligante opcional, A é uma seqüência de aminoácidos N-terminal opcional, B é uma seqüência de aminoácidos C-terminal opcional, e  $n$  é um número inteiro maior que 1.

O valor de  $n$  pode ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais, mas é preferivelmente 2 ou 3. A seqüência -A- está preferivelmente no terminal N do polipeptídeo, e a seqüência -B- está preferivelmente no terminal C do polipeptídeo.

De acordo com a invenção, pelo menos uma das porções -X- é uma seqüência de NMB 1870. Seqüências de NMB 1870 preferidas para uso como porções -X- são truncadas até e incluindo a seqüência de poli-glicina encontrada próximo ao

terminal N maduro, ou seja, elas são seqüências AG. As versões de AG de Id. de Seq. N°s: 1 a 3 são Id. de Seq. N°s: 22 a 24, respectivamente.

Para porções X, particularmente aquelas outras que não X<sub>1</sub>, é preferível que o peptídeo líder nativo seja omitido. Em uma modalidade, os peptídeos líderes serão deletados exceto por aqueles da porção -X- localizados no terminal N do polipeptídeo híbrido, ou seja, o peptídeo líder de X<sub>1</sub> será retido, mas os peptídeos líderes de X<sub>2</sub> ... X<sub>n</sub> serão omitidos. Isso é equivalente a deletar todos os peptídeos líderes e usar o peptídeo líder de X<sub>1</sub> como porção -A-.

Para cada n casos de [-X-L-], seqüência de aminoácidos ligante -L- pode estar presente ou ausente. Por exemplo, quando n = 2 o híbrido pode ser NH<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-COOH, NH<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-COOH, NH<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-COOH, NH<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-COOH etc. Seqüências de aminoácidos ligantes -L- serão tipicamente curtas (por exemplo, 20 ou menos aminoácidos, ou seja, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem seqüências de peptídeos curtas que facilitam a clonagem, ligante de poli-glicina (ou seja, Gly<sub>n</sub> em que n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais), e rótulos de histidina (ou seja, His<sub>n</sub> em que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais). Outras seqüências de aminoácidos de ligante adequadas serão aparentes para aqueles habilitados na técnica. Um ligante útil é GSGGGG (Id. de Seq. N°: 15), com o dipeptídeo Gly-Ser sendo formado a partir de um sítio de restrição BamHI, assim ajudando na clonagem e manipulação, e o tetrapeptídeo Gly<sub>4</sub> (Id. de Seq. N°: 16) é um outro ligante de poli-glicina típico. Um outro ligante útil é Id. de Seq. N°: 17, que pode ser opcionalmente

precedido por um dipeptídeo Gly-Ser (Id. de Seq. N°: 18, de BamHI) ou um dipeptídeo Gly-Lys (Id. de Seq. N°: 19, de HindIII).

-A- é uma seqüência de aminoácidos de terminal N  
5 opcional. Essa será tipicamente curta (por exemplo, 40 ou menos aminoácidos, ou seja, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem seqüências líderes para direcionar o  
10 tráfego de proteínas, ou seqüências curtas de peptídeos que facilitam a clonagem ou purificação (por exemplo, rótulos de histidina, ou seja, His<sub>n</sub> em que  $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$  ou mais). Outras seqüências de aminoácidos de terminal N adequadas serão aparentes para aqueles habilitados na  
15 técnica. Se X<sub>1</sub> for desprovido de sua própria metionina N-terminal, -A- poderá fornecer tal resíduo de metionina no polipeptídeo traduzido (por exemplo, -A- é um resíduo de Met único). A Met pode ser para o N-terminal de uma seqüência de ligante como Id. de Seq. N°: 17 (ou seja, Id. de Seq.: 21), ou no N-terminal de uma seqüência curta (por  
20 exemplo, Id. de Seq. N°: 26). Exemplos de seqüências -A- incluem Id. de Seq. Nos: 21, 26 e 43.

-B- é uma seqüência de aminoácidos C-terminal  
25 opcional. Essa será tipicamente curta (por exemplo, 40 ou menos aminoácidos, ou seja, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem seqüências para direcionar tráfego de proteína, seqüências curtas de peptídeos que facilitam a  
30 clonagem ou purificação (por exemplo, que compreende

rótulos de histidina, ou seja, His em que  $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$  ou mais, por exemplo, Id. de Seq. N°: 20), ou seqüências que aumentam a estabilidade do polipeptídeo. Outras seqüências de aminoácidos de terminal C adequadas  
5 serão aparentes para aqueles habilitados na técnica. Uma porção -B- adequada é Id. de Seq. N°: 41, em que Leu-Glu (Id. de Seq. N°: 44) acima de Id. de Seq. N°: 20 surge de um sítio de restrição XhoI.

Em polipeptídeos híbridos preferidos da invenção, uma  
10 das porções X é uma seqüência de "proteína 936". Proteína 936 foi originalmente revelada como Id. de Seq. N° 2884 na ref. 3 (Id. de Seq. N°: 14 nesta especificação), e uma versão de sinal-truncada dessa seqüência é Id. de Seq. N°: 25 nesta especificação. Seqüências "936" para uso com a  
15 invenção incluem seqüências (i) que têm pelo menos  $z\%$  de identidade de seqüência ao Id. de Seq. N°: 25, e/ou (ii) que compreendem um fragmento de pelo menos  $f$  aminoácidos contíguos de Id. de Seq. N°: 25. O valor de  $z$  é selecionado de 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99,  
20 99,5, 99,9 ou mais. O valor de  $f$  é selecionado de 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 75, 100, 150, 200 ou mais.

Alguns polipeptídeos híbridos preferidos incluem uma seqüência 936 e duas seqüências de NMB1870. As duas  
25 seqüências de NMB1870 serão de duas diferentes famílias, por exemplo, I & II, I & III, ou II & III. Híbridos preferidos incluem uma seqüência 936, uma seqüência de NMB 1870 família I e uma seqüência de NMB 1870 família II. A 936 é preferivelmente a mais N-terminal dessas três  
30 seqüências. Id. de Seq. N°s: 28, 29, 34 & 35 são exemplos

de polipeptídeos híbridos que incluem uma seqüência 936 para o N-terminal de seqüências NMB1870 de duas diferentes famílias.

Por exemplo, quando  $n = 2$  então  $X_1$  pode ser uma seqüência '936' e  $X_2$  pode ser uma seqüência de NMB1870. De modo similar, quando  $n = 3$  então  $X_1$  pode ser uma seqüência '936' e  $X_2$  pode ser uma seqüência de NMB1870 de uma primeira família, e  $X_3$  pode ser uma seqüência de NMB1870 de uma segunda família.

Em polipeptídeos tandem preferidos da invenção,  $n$  é 2 ou 3.

Quatorze polipeptídeos híbridos e tandem específicos da invenção são revelados como Id. de Seq. N°s: 27 a 40 que, para um guia, são construídos a partir de Id. de Seq. N°s como se segue:

Id. Seq.	n	A	$X_1$	$L_1$	$X_2$	$L_2$	$X_3$	$L_3$	B
27	2	21	23	15	22	44	-	-	20
28	3	26	25	15	22	18	23	44	20
29	3	26	25	18	23	45	22	44	20
30	3	21	23	15	22	18	24	42	20
31	3	21	23	18	24	15	22	44	20
32	3	43	22	18	23	18	24	42	20
33	2	21	23	15	22	-	-	-	-
34	3	26	25	15	22	18	23	-	-
35	3	26	25	18	23	15	22	-	-
36	3	21	23	18	24	15	22	-	-
37	3	21	23	15	22	18	24	-	-
38	3	43	22	18	23	18	24	-	-
39	3	43	22	18	24	19	23	44	20
40	3	43	22	18	24	19	23	-	-

Polipeptídeos híbridos e tandem também preferidos da invenção incluem uma seqüência da família IV. Portanto, pelo menos uma porção X pode (i) ter pelo menos v% de identidade de seqüência ao Id. de Seq. N°: 95, e/ou (ii)



compreender um fragmento de pelo menos vv aminoácidos contíguos de Id. de Seq. N°: 95. O valor de v é selecionado de 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 ou mais. O valor de vv é selecionado de 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 75, 100, 150, 200 ou mais. Por inclusão da seqüência da família IV, a atividade de soro contra cepas 269 cpx pode ser melhorada.

#### **Fragmentos e domínios de NMB1870**

10 Em vez de usar uma seqüência de comprimento total de NMB1870 (por exemplo, Id. de Seq. N°: 1), a invenção usará tipicamente um fragmento. Por exemplo, os aminoácidos acima do terminal N maduro (Cys-20 em Id. de Seq. N°: 1) serão geralmente omitidos. Preferivelmente, uma seqüência "AG" 15 será usada, em que todos os aminoácidos até e incluindo a seqüência de poli-glicina de NMB 1870 são deletados, ou seja, deleção de aminoácidos 1-26 em Id. de Seq. N°: 1. Em Id. de Seq. N°s: 27 a 40, por exemplo, a tabela acima mostra que  $\Delta G$  se forma de NMB1870 (ou seja, Id. de Seq. 20 N°s: 22 a 24) são usados.

Como revelado na referência 13, NMB 1870 pode ser dividido em três domínios, referidos como A, B e C. Com a seqüência da família I (Id. de Seq. N°: 1), em que o N-terminal da lipoproteína madura processada é Cys-20, os 25 três domínios são (A) 1-119, (B) 120-183 e (C) 184-274:

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHRDKGLQSLTLDQSVRKNEKLEK  
LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSREFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFOEQ  
IQDSEHSCKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQNG  
KIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKGSYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTVNG  
IRHIGLAAKQ

30 A forma madura do domínio 'A', de sua cisteína C-

terminal, é chamada 'A<sub>maduro</sub>'.

Para MC58, os domínios são: 'A' = Id. de Seq. N°: 4; 'B' = Id. de Seq. N°: 5; 'C' = Id. de Seq. N°: 6; e "A<sub>maduro</sub>" = Id. de Seq. N°: 13. Múltiplas seqüências de NMB1870 são  
5 conhecidas [por exemplo, veja as refs. 4, 8 e 10] e podem ser facilmente alinhadas com o uso de métodos padrão. Por tais alinhamentos, a pessoa habilitada pode identificar domínios 'A' (e 'A<sub>maduro</sub>'), 'B' e 'C' em qualquer seqüência de NMB1870 dada por comparação às coordenadas na seqüência  
10 de MC58. Para facilidade de referência, no entanto, os domínios são definidos abaixo:

— Domínio 'A' em uma dada seqüência de NMB 1870 é o fragmento daquela seqüência que, quando alinhado ao Id. de Seq. N°: 1 com o uso de um algoritmo de alinhamento em  
15 pares, inicia com o aminoácido alinhado a Met-1 de Id. de Seq. N°: 1 e termina com o aminoácido alinhado a Lys-119 de Id. de Seq. N°: 1.

— Domínio "A<sub>maduro</sub>" em uma seqüência de NMB1870 dada é o fragmento daquela seqüência que, quando alinhado a Id.  
20 de Seq. N°: 1 com o uso de um algoritmo de alinhamento em pares, inicia com o aminoácido alinhado a Cys-20 de Id. de Seq. N°: 1 e termina com o aminoácido alinhado a Lys-119 de Id. de Seq. N°: 1.

— Domínio 'B' em uma dada seqüência de NMB 1870 é o  
25 fragmento daquela seqüência que, quando alinhado ao Id. de Seq. N°: 1 com o uso de um algoritmo de alinhamento em pares, inicia com o aminoácido alinhado a Gln-120 de Id. de Seq. N°: 1 e termina com o aminoácido alinhado a Gly-183 de Id. de Seq. N°: 1.

30 — Domínio 'C' em uma seqüência de NMB1870 dada é o

fragmento daquela seqüência que, quando alinhado ao Id. de Seq. N°: 1 com o uso de um algoritmo de alinhamento em pares, inicia com o aminoácido alinhado a Lys-184 de Id. de Seq. N°: 1 e termina com o aminoácido alinhado a Gln-274 de  
5 Id. de Seq. N° 1.

O algoritmo de alinhamento em pares preferido para a definição dos domínios é o algoritmo de alinhamento global de Needleman-Wunsch [14], com o uso de parâmetros padrão (por exemplo, com penalidade de "Gap opening" = 10,0, e com  
10 penalidade de "Gap extension" = 0,5, com o uso da matriz de pontuação EBLOSUM62). Esse algoritmo é convenientemente implementado na ferramenta "needle" no pacote EMBOSS [15].

As seqüências de NMB 1870 estão dentro de três famílias [4,10] que são aqui referidas como famílias I, II  
15 e III. As seqüências prototípicas para as famílias I-III são, respectivamente, Id. de Seq. N°S: 1-3. Os métodos filogenéticos e de dendrograma da referência 4 podem ser seguidos para determinar facilmente a família para qualquer seqüência de NMB 1870 dada, e um alinhamento em pares com  
20 cada uma das três seqüências de NMB1870 prototípicas também pode ser usado para encontrar a mais próxima combinação de família. As seqüências estão distintamente em três famílias, com identidade de seqüência sendo 74,1% entre as famílias I & II, 62,8% entre as famílias I & III, e 84,7%  
25 entre as famílias II & III, e com variação de seqüência em cada família sendo baixa (por exemplo, um mínimo de 91,6% de identidade na família I, 93,4% na família II e 93,2% na família III).

Como uma rápida via de determinação da família da  
30 seqüência sem necessitar de uma análise filogenética, a

seqüência pode ser colocada na família I se ela tem pelo menos 85% de identidade de seqüência ao Id. de Seq. N°: 1, pode ser colocada na família II se ela tem pelo menos 85% de identidade de seqüência ao Id. de Seq. N°: 2, e pode ser colocada na família III se ela tem pelo menos 85% de identidade de seqüência ao Id. de Seq. N°: 3.

Com base no alinhamento na Figura 6 da referência 4, domínios de exemplo A, B e C para as três famílias prototípicas de NMB 1870 (Id. de Seq. N°S: 1 a 3) são como se segue:

↓domínio da família→	A	B	C
I	Id. de Seq. N°: 4	Id. de Seq. N°: 5	Id. de Seq. N°: 6
II	Id. de Seq. N°: 7	Id. de Seq. N°: 8	Id. de Seq. N°: 9
III	Id. de Seq. N°: 10	Id. de Seq. N°: 11	Id. de Seq. N°: 12

Domínios preferidos para uso com a invenção compreendem as seqüências de aminoácidos que (a) têm pelo menos x% de identidade de seqüência a um ou mais de Id. de Seq. N°S: 4 a 12, e/ou (a) compreendem um fragmento de pelo menos y seqüências de aminoácidos consecutivas de um ou mais de Id. de Seq. N°S: 4 a 12.

O valor de x é selecionado de 50, 60, 70, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 ou mais. O valor de y é selecionado de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50 ou mais. Em polipeptídeos que compreendem seqüências de NMB1870 de

diferentes famílias, os valores de x e y para cada família podem ser o mesmo ou diferentes.

Uma seqüência de domínio 'A' é preferivelmente entre  $a_1$  e  $a_2$  (inclusive) aminoácidos de comprimento, em que:  $a_1$  é selecionado de 110, 115, 120, 125 e 130; e  $a_2$  é selecionado de 115, 120, 125, 130 e 135.

Uma seqüência de domínio 'B' é preferivelmente entre  $b_1$  e  $b_2$  (inclusive) aminoácidos de comprimento, em que:  $b_1$  é selecionado de 55, 60, 65 e 70; e  $b_2$  é selecionado de 60, 65, 70 e 75.

Um domínio 'C' seqüência é preferivelmente entre  $c_1$  e  $c_2$  (inclusive) aminoácidos de comprimento, em que:  $c_1$  é selecionado de 80, 85, 90, 95 e 100; e  $c_2$  é selecionado de 85, 90, 95, 100 e 105.

Como desejado, qualquer forma de comprimento total de NMB 1870 pode ser substituída por um único domínio de NMB1870 (A, B ou C) ou por dois domínios de NMB1870 (AB, AC ou BC).

#### **Formas polimórficas de NMB1870**

Várias formas polimórficas de NMB1870 foram previamente relatadas. Novas seqüências foram identificadas, e assim a invenção fornece um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em Id. de Seq. N°s: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 e 94. Id. de Seq. N°: 94 (veja também Id. de Seq. N°: 140 da ref. 12) é um exemplo de uma seqüência da família IV, que pode ter surgido por recombinação entre famílias I e III.

#### **Polipeptídeos**

A invenção fornece os vários polipeptídeos acima

descritos.

Ela também fornece um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em Id. de Seq. N°s: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36,  
5 37, 38, 39, 40, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56. Ela também fornece polipeptídeos que têm uma seqüência de aminoácidos (a) que tem identidade de seqüência a uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em Id. de Seq. N°S: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36,  
10 37, 38, 39, 40, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56 e/ou (b) que compreende um fragmento de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em Id. de Seq. N°s: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56. O grau  
15 de identidade de seqüência é preferivelmente maior que 50% (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais). O fragmento preferivelmente compreende 7 ou mais aminoácidos consecutivos da seqüência de início (por exemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28,  
20 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 70, 85, 90, 95, 100 ou mais).

NMB1870 é naturalmente uma lipoproteína em *N. meningitidis*. Também é lipidado quando expresso em *E. coli*. Polipeptídeos da invenção podem ter um resíduo de cisteína  
25 C-terminal, que pode ser lipidado, por exemplo, que compreende um grupo palmitoil.

Uma característica de polipeptídeos preferidos da invenção é a capacidade de induzir anticorpos anti-meningocócicos bactericidas após administração a um animal  
30 hospedeiro.

Os polipeptídeos da invenção podem ser preparados por vários meios, por exemplo, por síntese química (pelo menos em parte), por digestão de polipeptídeos mais compridos com o uso de proteases, por tradução de RNA, por purificação de cultura de células (por exemplo, de expressão recombinante ou de cultura de *N. meningitidis*) etc. A expressão heteróloga em um hospedeiro de *E.coli* é uma via de expressão preferida (por exemplo, em DH5a, BL21(DE3), BLR etc.).

10 Os polipeptídeos da invenção podem ser anexados ou imobilizados a um suporte sólido.

Os polipeptídeos da invenção podem compreender um rótulo detectável, por exemplo, um rótulo radioativo, um rótulo fluorescente, ou um rótulo de biotina. Isso é particularmente útil em técnicas de imunensaio.

Os polipeptídeos podem ter várias formas (por exemplo, nativa, fusões, glicosiladas, não glicosiladas, lipidadas, de pontes de dissulfeto etc.).

Os polipeptídeos são preferivelmente preparados em forma substancialmente pura ou substancialmente isolada (ou seja, substancialmente livre de outros polipeptídeos de *Neisseria* ou de célula hospedeira) ou forma substancialmente isolada. Em geral, os polipeptídeos são fornecidos em um ambiente de ocorrência não natural, por exemplo, eles são separados de seu ambiente de ocorrência natural. Em certas modalidades, o polipeptídeo está presente na composição que é enriquecida para o polipeptídeo quando comparada a um controle. Como tal, polipeptídeo purificado é fornecido, em que purificado significa que o polipeptídeo está presente em uma

composição que é substancialmente livre de ouros polipeptídeos expressos, em que, por substancialmente livre, entende-se que menos que 90%, usualmente menos que 60% e mais comumente menos que 50% da composição é feita de outros polipeptídeos expressos.

O termo "polipeptídeo" refere-se a polímeros de aminoácido de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, ele pode compreender aminoácidos modificados, e ele pode ser interrompido por não aminoácidos. O termo também engloba um polímero de aminoácido que foi modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ponte de dissulfeto, glicosilção, lipidação, acetilação, fosforilação ou qualquer outra manipulação ou modificação, como conjugação com um componente de rotulagem. Também incluídos dentro da definição, estão, por exemplo, polipeptídeos que contêm um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Os polipeptídeos podem ocorrer como cadeias únicas ou cadeias associadas.

### **Ácidos nucleicos**

A invenção fornece ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção como acima definido. A invenção também fornece ácido nucleico que compreende: (a) um fragmento de pelo menos  $n$  nucleotídeos consecutivos do referido ácido nucleico, em que  $n$  é 10 ou mais (por exemplo, 12, 14, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 500 ou mais); e/ou (b) uma seqüência que tem pelo menos 50% (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais) de identidade de seqüência



ao referido ácido nucléico.

Além disso, a invenção fornece ácido nucléico que pode hibridizar ao ácido nucléico que codifica um polipeptídeo da invenção, preferivelmente sob condições de "alto rigor" (por exemplo, 65°C em uma solução de 0,1 x SSC, 0,5% SDS).

Ácidos nucléicos da invenção podem ser usados em reações de hibridização (por exemplo, "Northern ou Southern blots", ou em microarranjos de ácido nucléico ou 'chips de gene') e reações de amplificação (por exemplo, PCR, SDA, SSSR, LCR, TMA, NASBA etc.) e outras técnicas de ácido nucléico.

Os ácidos nucléicos da invenção podem ser preparados de vários modos, por exemplo, por síntese química (por exemplo, síntese de fosforamidita de DNA) no todo ou em parte, por digestão de ácidos nucléicos mais longos com o uso de nucleases (por exemplo, enzimas de restrição), por união de ácidos nucléicos ou nucleotídeos mais curtos (por exemplo, com o uso de ligases ou polimerases), de bibliotecas genômicas ou de cDNA etc.

Os ácidos nucléicos da invenção podem tomar várias formas, por exemplo, de filamento único, de filamento duplo, vetores, iniciadores, marcadores, rotulados, não rotulados etc.

Os ácidos nucléicos da invenção estão preferivelmente em forma isolada ou substancialmente isolada.

A invenção inclui ácido nucléico que compreende seqüências complementares àquelas acima descritas, por exemplo, para anti-senso ou marcação, ou para uso como iniciadores.

O termo "ácido nucléico" inclui DNA e RNA, e também

seus análogos, como aqueles que contêm estruturas modificadas, e também ácidos nucleicos de peptídeo (PNA) etc.

Ácido nucleico de acordo com a invenção pode ser rotulado, por exemplo, com um rótulo radioativo ou fluorescente. Isso é particularmente útil quando o ácido nucleico deve ser usado em técnicas de detecção de ácido nucleico, por exemplo, quando o ácido nucleico é um iniciador ou como um marcador para uso em técnicas como PCR, LCR, TMA, NASBA etc.

A invenção também fornece vetores que compreendem seqüências de nucleotídeos da invenção (por exemplo, vetores de clonagem ou expressão, como aqueles adequados para imunização de ácido nucleico) e células hospedeiras transformadas com tais vetores.

#### **Respostas bactericidas**

Polipeptídeos preferidos da invenção podem despertar respostas de anticorpo que são bactericidas contra meningococos. Respostas de anticorpo bactericida são convenientemente medidas em camundongos e são um indicador padrão da eficácia de vacina [por exemplo, veja a nota final 14 da referência 2]. Os polipeptídeos da invenção podem despertar preferivelmente uma resposta de anticorpo que é bactericida contra pelo menos uma cepa de *N. meningitidis* de cada um de pelo menos dois dos seguintes grupos de cepas:

(I) MC58, gb185 (=M01-240185), m4030, m2197, m2937, iss1001, NZ394/98, 67/00, 93/114, bz198, m1390, nge28, lnp17592, 00-241341, f6124, 205900, m198/172, bz133, gb149 (=M01-240149), nm008, nm092, 30/00, 39/99, 72/00, 95330,

bz169, bz83, cu385, h44/76, m1590, m2934, m2969, m3370, m4215, m4318, n44/89, 14847.

(II) 961-5945, 2996, 96217, 312294, 11327, a22, gb013 (=M01-240013), e32, m1090, m4287, 860800, 599, 95N477, 90-5 18311, c11, m986, m2671, 1000, m1096, m3279, bz232, dk353, m3697, ngh38, L93/4286.

(III) M1239, 16889, gb355 (=M01-240355), m3369, m3813, ngp165.

Por exemplo, um polipeptídeo quimérico pode despertar  
10 uma resposta bactericida eficaz contra duas ou mais das cepas de sorogrupo B de *N. meningitidis* MC58, 961-5945 e M1239.

O polipeptídeo pode despertar preferivelmente uma resposta de anticorpo que é bactericida contra pelo menos  
15 50% das cepas de sorogrupo B meningocócicas clinicamente relevantes (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais). O polipeptídeo pode despertar uma resposta de anticorpo que é bactericida contra cepas de sorogrupo B de *N. meningitidis* e cepas de pelo menos um (por exemplo, 1, 2,  
20 3, 4) dos sorogrupos A, C, W135 e Y. O polipeptídeo pode despertar uma resposta de anticorpo que é bactericida contra cepas de *N. gonococcus* e/ou *N. cinerea*. O polipeptídeo pode despertar uma resposta que é bactericida contra cepas de pelo menos dois dos três principais ramos  
25 do dendrograma mostrado na Figura 5 da referência 4.

O polipeptídeo pode despertar uma resposta de anticorpo que é bactericida contra cepas de *N. meningitidis* em pelo menos 2 (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7) das linhagens hipervirulentas ET-37, ET-5, grupo A4, linhagem  
30 3, subgrupo I, subgrupo III e subgrupo INT-1 [16,17]. Os

polipeptídeos podem induzir adicionalmente resposta bactericida de anticorpos contra uma ou mais linhagens hiperinvasivas.

Os polipeptídeos podem despertar uma resposta de anticorpo que é bactericida contra cepas de *N. meningitidis* em pelo menos 2 (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7) dos seguintes tipos de seqüência de multilocus: ST1, ST4, ST5, ST8, ST11, ST32 e ST41 [18]. O polipeptídeo também pode despertar uma resposta de anticorpo que é bactericida contra cepas ST44.

O polipeptídeo não precisa induzir anticorpos bactericidas contra cada e todas as cepas de MenB nas linhagens especificadas ou MLST; ao contrário, para qualquer grupo dado de quatro ou mais cepas de meningococo sorogrupo B em uma linhagem hipervirulenta particular ou MLST, os anticorpos induzidos pela composição são preferivelmente bactericidas contra pelo menos 50% (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais) do grupo. Grupos preferidos de cepas incluirão cepas isoladas em pelo menos quatro dos seguintes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR e CU. O soro preferivelmente tem um título bactericida de pelo menos 1024 (por exemplo,  $2^{10}$ ,  $2^{11}$ ,  $2^{12}$ ,  $2^{13}$ ,  $2^{14}$ ,  $2^{15}$ ,  $2^{16}$ ,  $2^{17}$ ,  $2^{18}$  ou maior, preferivelmente pelo menos  $2^{14}$ ), ou seja, o soro é capaz de matar pelo menos 50% das bactérias de teste de uma cepa particular quando diluída a 1:1.024, por exemplo, como descrito na nota final 14 da referência 2. Polipeptídeos quiméricos preferidos podem despertar uma resposta de anticorpo em camundongos que permanecem bactericidas mesmo quando o soro é diluído a 1:4.096 ou mais.

## Imunização

Os polipeptídeos da invenção são preferivelmente fornecidos como composições imunogênicas, e a invenção fornece uma composição imunogênica da invenção para uso  
5 como um medicamento.

A invenção também fornece um método para despertar uma resposta de anticorpo em um mamífero, que compreende a administração de uma composição imunogênica da invenção ao mamífero. A resposta de anticorpo é preferivelmente uma  
10 resposta de anticorpo protetora e/ou bactericida.

A invenção também fornece um método para proteção de um mamífero contra uma infecção por *Neisseria* (por exemplo, meningocócica), que compreende a administração ao mamífero de uma composição imunogênica da invenção.

15 A invenção fornece polipeptídeos quiméricos da invenção para uso como medicamentos (por exemplo, como composições imunogênicas ou como vacinas) ou como reagentes diagnósticos. Ela também fornece o uso de ácido nucléico, polipeptídeo, ou anticorpo da invenção na manufatura de um  
20 medicamento para a prevenção de infecção por *Neisseria* (por exemplo, meningocócica) em um mamífero.

O mamífero é preferivelmente um humano. O humano pode ser um adulto ou, preferivelmente, uma criança. Quando a vacina é para uso profilático, o humano é preferivelmente  
25 uma criança (por exemplo, um bebê); quando a vacina é para uso terapêutico, o humano é preferivelmente um adulto. A vacina para crianças também pode ser administrada a adultos, por exemplo, para avaliar a segurança, dosagem, imunogenicidade etc.

30 Os usos e métodos são particularmente úteis para a

prevenção/tratamento de doenças que incluem, mas não são limitadas a, meningite (particularmente meningite bacteriana) e bacteremia.

5 A eficácia do tratamento terapêutico pode ser testada por monitoramento da infecção por *Neisseria* após administração da composição da invenção. A eficácia do tratamento profilático pode ser testada por monitoramento das respostas imunes contra NMB 1870 após administração da composição.

10 A imunogenicidade das composições da invenção pode ser determinada por administração delas a indivíduos de teste (por exemplo, crianças de 12-16 meses de idade, ou modelos animais [19]) e então determinação dos parâmetros padrão que incluem títulos de anticorpos bactericidas séricos  
15 (SBA) e ELISA (GMT). Essas respostas imunes serão geralmente determinadas por volta de 4 semanas depois da administração da composição, e comparadas a valores determinados antes da administração da composição. Um aumento de SBA de pelo menos 4 vezes ou 8 vezes é  
20 preferido. Quando mais de uma dose da composição é administrada, mais de uma determinação pós-administração pode ser feita.

Composições preferidas da invenção podem conferir um título de anticorpo em um paciente que é superior ao  
25 critério para soro-proteção para cada componente antigênico para uma percentagem aceitável de indivíduos humanos. Antígenos com um título de anticorpo associado acima do qual um hospedeiro é considerado como sendo soroconvertido contra o antígeno são bem conhecidos, e tais títulos são  
30 publicados por organizações como WHO. Preferivelmente, mais

de 80% de uma amostra estatisticamente significativa de indivíduos é soroconvertida, mais preferivelmente mais de 90%, ainda mais preferivelmente mais de 93%, e ainda mais preferivelmente 96-100%.

5           Composições da invenção serão geralmente administradas diretamente a um paciente. A liberação direta pode ser realizada por injeção parenteral (por exemplo, por via subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, ou ao espaço intersticial de um tecido), ou por administração  
10   retal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar ou outra administração mucosa. A administração intramuscular à coxa ou braço é preferida. A injeção pode ser por meio de uma agulha (por exemplo, uma agulha hipodérmica), mas injeção livre de agulha pode ser  
15   alternativamente usada. Uma dose intramuscular típica é de cerca de 0,5 ml.

A invenção pode ser usada para despertar imunidade sistêmica e/ou mucosa.

O tratamento de dosagem pode ser um esquema de dose  
20   única ou um esquema de dose múltipla. Doses múltiplas podem ser usadas em um esquema de imunização primária e/ou em um esquema de imunização de reforço. Um esquema de dose primária pode ser seguido por um esquema de dose de reforço. O tempo adequado entre as doses primárias (por  
25   exemplo, entre 4-16 semanas) e entre a dose primária e de reforço pode ser rotineiramente determinado.

A composição imunogênica da invenção incluirá geralmente um veículo farmacologicamente aceitável, que pode ser qualquer substância que não induza por si a produção de  
30   anticorpos danosos ao paciente que recebe a composição, e

que pode ser administrado sem toxicidade. Veículos farmacologicamente aceitáveis podem incluir líquidos como água, solução salina, glicerol e etanol. Substâncias auxiliares, como agentes umectantes ou emulsificantes, substâncias de tamponamento de pH, e outras, também podem estar presentes em tais veículos. Uma discussão completa de veículos adequados é disponível na ref. 20.

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

A composição é preferivelmente estéril. Ela é preferivelmente livre de pirógeno. Ela é preferivelmente tamponada, por exemplo, entre pH 6 e pH 8, geralmente em torno de pH 7. Quando a composição compreende um sal de hidróxido de alumínio, é preferível usar um tampão de histidina [21]. As composições da invenção podem ser



isotônicas com relação a humanos.

As composições imunogênicas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de imunógeno, bem como qualquer outra de outros componentes especificados, como necessário.

5 Por "quantidade imunologicamente eficaz", entende-se que a administração daquela quantidade a um indivíduo, em uma dose única ou como parte de uma série, é eficaz para tratamento ou prevenção. Essa quantidade varia dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, da  
10 idade, do grupo taxonômico do indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata etc.), da capacidade do sistema imune do indivíduo de sintetizar anticorpos, do grau de proteção desejado, da formulação da vacina, da avaliação do médico sobre a situação médica, e de outros  
15 fatores relevantes. Espera-se que a quantidade esteja dentro de uma faixa relativamente ampla que pode ser determinada através de experimentos rotineiros. As dosagens de tratamentos podem ser um esquema de dose única ou um esquema de dose múltipla (por exemplo, incluindo doses de  
20 reforço). A composição pode ser administrada junto com outros agentes imuno-reguladores.

Adjuvantes que podem ser usados em composições da invenção incluem, sem limitação:

**A. Composições que contêm mineral**

25 Composições que contêm mineral adequadas para uso como adjuvantes na invenção incluem sais minerais, como sais de alumínio e sais de cálcio. A invenção inclui sais minerais como hidróxidos (por exemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por exemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos etc. [por  
30 exemplo, veja capítulos 8 & 9 da ref. 22], ou misturas de

diferentes compostos minerais, com os compostos tomando qualquer forma adequada (por exemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), e com absorção sendo preferida. As composições que contêm mineral também podem ser formuladas  
5 como um partícula de sal de metal [23].

Fosfatos de alumínio são particularmente preferidos, particularmente em composições que incluem um antígeno de sacarídeo de *H. influenzae*, e um adjuvante típico é hidroxifosfato de alumínio amorfo com proporção molar de  
10  $PO_4/Al$  entre 0,84 e 0,92, incluída a 0,6 mg  $Al^{3+}/ml$ . A absorção com uma baixa dose de fosfato de alumínio pode ser usada, por exemplo, entre 50 e 100  $\mu g Al^{3+}$  por conjugado por dose. Quando há mais de um conjugado na composição, nem todos os conjugados precisam ser absorvidos.

#### 15 B. Emulsões oleosas

Composições de emulsões oleosas adequadas para uso como adjuvantes na invenção incluem emulsões de esqualeno-água como MF59 [capítulo 10 da ref. 22; veja também ref. 24] (5% esqualeno, 0,5% Tween 80, e 0,5% Span 85,  
20 formulados em partículas submícron com o uso de um microfluidificador). Adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante incompleto de Freund (IFA) também podem ser usados. Adjuvantes de emulsões óleo em água são úteis com a invenção.

#### 25 C. Formulações de saponina [capítulo 22 da ref. 22]

Formulações de saponina também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Saponinas são um grupo heterólogo de glicosídeos de esterol e glicosídeos triterpenóides que são encontrados na casca, folha, ramos, raízes e mesmo  
30 flores de uma ampla variedade de espécies de plantas.

Saponina da casca da árvore Molina *Quillaia saponaria* tem sido amplamente estudada como adjuvantes. Saponina também pode ser comercialmente obtida de *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (véu de noiva), e 5 *Saponaria officianalis* (raiz sabão). Formulações de adjuvante de saponina incluem formulações purificadas, como QS21, bem como formulações lipídicas, como ISCOMs. QS21 é comercializado como Stimulon™.

Composições de saponina têm sido purificadas com o uso 10 de HPLC e RP-HPLC. Foram identificadas frações específicas purificadas com o uso dessas técnicas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. Preferivelmente, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é revelado na ref. 25. As formulações de saponina também podem compreender um 15 esterol, como colesterol [26].

Combinações de saponinas e colesteróis podem ser usadas para formar partículas únicas chamadas complexos imuno-estimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 da ref. 22]. ISCOMs tipicamente também incluem um fosfolipídeo como 20 fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Qualquer saponina conhecida pode ser usada em ISCOMs. Preferivelmente, o ISCOM inclui um ou mais de QuiIA, QHA & QHC. ISCOMs são também descritos nas refs. 26-28. Opcionalmente, os ISCOMs podem ser desprovidos de 25 detergente adicional [29].

Uma revisão do desenvolvimento de adjuvantes com base em saponina pode ser encontrada nas refs. 30 & 31.

#### **D. Virossomos e partículas semelhantes a vírus**

Virossomos e partículas semelhantes a vírus (VLPs) 30 podem ser também usados como adjuvantes na invenção. Essas

estruturas geralmente contêm uma ou mais proteínas de um vírus opcionalmente combinadas ou formuladas com um fosfolipídeo. Elas são geralmente não patogênicas, não replicam, e geralmente não contêm qualquer um dos genomas virais nativos. As proteínas virais podem ser recombinantemente produzidas ou isoladas de vírus inteiros. Essas proteínas virais adequadas para uso em virossomos ou VLPs incluem proteínas derivadas de vírus influenza (como HA ou NA), vírus da Hepatite B (com proteínas de núcleo ou capsídeo), vírus da Hepatite E, vírus do sarampo, vírus Sindbis, Rotavírus, vírus da febre aftosa, Retrovírus, vírus Norwalk, Papiloma vírus humano, HIV, RNA-fagos, Q $\beta$ -fago (como proteínas de revestimento), GA-fago, fr-fago, AP205 fago, e Ty (como retrotransposon Ty proteína p1). VLPs são discutidos também nas refs. 32-37. Virossomos são discutidos adicionalmente, por exemplo, na ref. 38

#### **E. Derivados bacterianos ou microbianos**

Adjuvantes adequados para uso na invenção incluem derivados bacterianos ou microbianos como derivados não tóxicos de lipopolissacarídeo enterobacteriano (LPS), derivados de Lipídeo A, oligonucleotídeos imunoestimulantes, e toxinas de ribosilação de ADP e derivados desintoxicados destes.

Derivados não tóxicos de LPS incluem monofosforil lipídeo A (MPL) e MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL é uma mistura de lipídeo A monofosforil 3 de-O-acilado com 4,5 ou 6 cadeias aciladas. Uma forma de "partícula pequena" preferida de lipídeo A monofosforil 3 de-O-acilado é revelada na ref. 39. Tais "partículas pequenas" de 3dMPL são pequenas o suficiente para serem filtradas de modo

estéril através de uma membrana de 0,22 µm [39]. Outros derivados de LPS não tóxicos incluem imitadores de monofosforil lipídeo A, como derivados de aminoalquil glicosaminida fosfato, por exemplo, RC-529 [40,41].

5 Derivados de lipídeo A incluem derivados de lipídeo A de *Escherichia coli* como OM-174. OM-174 é descrito, por exemplo, nas refs. 42 & 43.

Oligonucleotídeos imunoestimulantes adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem seqüências de nucleotídeos que contêm um motivo CpG (uma seqüência de dinucleotídeo que contém uma citosina não metilada ligada por uma ligação de fosfato a uma guanósina). RNAs de duplo filamento e oligonucleotídeos contendo seqüências palindrômicas ou poli(dG) também se mostraram  
10 imunoestimulantes.  
15

As CpGs podem incluir modificações/análogos de nucleotídeo como modificações de fosforotioato e podem ser de filamento duplo ou de filamento único. As referências 44, 45 e 46 revelam possíveis substituições de análogo, por exemplo, substituição de guanósina com 2'-desoxi-7-deazaguanósina. O efeito adjuvante de oligonucleotídeos CpG é também discutido nas refs. 47-52.  
20

A seqüência de CpG pode ser direcionada para TLR9, como o motivo GTCGTT ou TTCGTT [53]. A seqüência de CpG pode ser específica para induzir uma resposta imune de Th1, como CpG-A ODN, ou ela pode ser mais específica para induzir uma resposta de célula B, como CpG-B ODN. CpG-A e CpG-B ODNs são discutidos nas refs. 54-56. Preferivelmente, CpG é um CpG-A ODN.  
25

30 Preferivelmente, o oligonucleotídeo de CpG é

construído de modo que a extremidade 5' seja acessível para reconhecimento de receptor. Opcionalmente, duas seqüências de oligonucleotídeos de CpG podem ser ligadas em suas extremidades 3' para formar "imunômeros". Veja, por exemplo, refs. 53 & 57-59.

Toxinas de ribosilação de ADP bacterianas e derivados desintoxicados destas podem ser usados como adjuvantes na invenção. Preferivelmente, a proteína é derivada de *E. coli* (enterotoxina instável ao calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT"), ou pertussis ("PT"). O uso de toxinas de ribosilação de ADP desintoxicadas como adjuvantes de mucosa é descrito na ref. 60, e como adjuvantes parenterais na ref. 61. A toxina ou toxóide está preferivelmente na forma de uma holotoxina, que compreende subunidades A e B. Preferivelmente, a subunidade A contém uma mutação desintoxicante; preferivelmente a subunidade B não é mutada. Preferivelmente, o adjuvante é um mutante LT desintoxicado como LT-K63, LT-R72, e LT-G192. O uso de toxinas de ribosilação de ADP e derivados desintoxicados desta, particularmente LT-K63 e LT-R72, como adjuvantes pode ser encontrado nas refs. 6269. Referência numérica para substituições de aminoácidos é preferivelmente baseada no alinhamento das subunidades A e B de toxinas de ribosilação de ADP apresentadas na ref. 70, especificamente aqui incorporadas em sua totalidade por referência.

#### **F. Imunomoduladores humanos**

Imunomoduladores humanos adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem citocinas, como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [71], etc.) [72], interferons (por exemplo,

interferon- $\gamma$ ), fator estimulante de colônia de macrófagos, e fator de necrose tumoral.

#### **G. Bioadesivos e Mucoadesivos**

Bioadesivos e Mucoadesivos também podem ser usados como adjuvantes na invenção. Bioadesivos adequados incluem microesferas de ácido hialurônico esterificadas [73] ou mucoadesivos como derivados entrecruzados de ácido poli(acrílico), álcool polivinílico, polivinil pirollidona, polissacarídeos e carboximetilcelulose. Quitosana e derivados desta também podem ser usados como adjuvantes na invenção [74].

#### **H. Micropartículas**

Micropartículas também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Micropartículas (ou seja, uma partícula de ~100 nm a ~150  $\mu$ m de diâmetro, mais preferivelmente ~200 nm a 30  $\mu$ m de diâmetro, e mais preferivelmente ~500 nm a ~10  $\mu$ m de diâmetro) formadas de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (por exemplo, um ácido poli( $\alpha$ -hidroxi), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona etc.) com poli(lactide-co-glicolídeo) são preferidas, opcionalmente tratadas para ter uma superfície negativamente-carregada (por exemplo, com SDS) ou uma superfície positivamente-carregada (por exemplo, com um detergente catiônico, como CTAB).

#### **I. Lipossomos (capítulos 13 & 14 da ref. 22)**

Exemplos de formulações em lipossomos adequadas para uso como adjuvantes são descritos nas refs. 75-77.

**J. Formulações de polioxietileno éter e polioxietileno éster**

Adjuvantes adequados para uso na invenção incluem olioxietileno éteres e polioxietileno ésteres [78]. Tais formulações também incluem tensoativos de éster de polioxietileno sorbitano em combinação com um octoxinol [79], bem como polioxietileno alquil éteres ou tensoativos de éster em combinação com pelo menos um tensoativo não iônico adicional como um octoxinol [80]. Polioxietileno éteres preferidos são selecionados do seguinte grupo: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), polioxietileno-9-esteoril éter, polioxietileno-8-esteoril éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter, e polioxietileno-23-lauril éter.

#### **K. Polifosfazeno (PCPP)**

Formulações de PCPP são descritas, por exemplo, nas refs. 81 e 82.

#### **L. Muramil peptídeos**

Exemplos de muramil peptídeos adequado para uso como adjuvantes na invenção incluem N-acetil muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), e N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

#### **M. Compostos de Imidazoquinolina.**

Exemplos de compostos de imidazoquinolina adequados para uso de adjuvantes na invenção incluem Imiquamod e seus homólogos (por exemplo, "Resiquimod 3M"), descrito adicionalmente nas refs. 83 e 84.

A invenção também pode compreender combinações de aspectos de um ou mais dos adjuvantes acima identificados. Por exemplo, as seguintes composições adjuvantes podem ser



usadas na invenção: (1) uma emulsão de saponina e uma emulsão óleo em água [85]; (2) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado de LPS não tóxico (por exemplo, 3dMPL) [86]; (3) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado de LPS não tóxico (por exemplo, 3dMPL) + um colesterol; (4) uma saponina (por exemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um esteroide) [87]; (5) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões óleo em água [88]; (6) SAF, contendo 10% esqualeno, 0,4% Tween 80<sup>TM</sup>, 5% polímero em bloco de plurônico L121, e thr-MDP, microfluidificados em uma emulsão submícron ou rotacionados para gerar uma emulsão de maior tamanho de partícula. (7) sistema de adjuvante Ribit<sup>TM</sup> (RAS), (Ribi Immunochem) contendo 2% esqualeno, 0,2% Tween 80, e um ou mais componentes da parede celular bacteriana do grupo que consiste em monofosforil lipídico A (MPL), trehalose dimicolato (TDM), e esqueleto de parede celular (CWS), preferivelmente MPL + CWS (Detox<sup>TM</sup>); e (8) um ou mais sais minerais (como um sal de alumínio) + um derivado não tóxico de LPS (como 3dMPL).

Outras substâncias que agem como agentes imunoestimulantes são reveladas no capítulo 7 da ref. 22.

Sais de alumínio (fosfatos de alumínio e particularmente hidroxifosfatos, e/ou hidróxidos e particularmente oxihidróxidos) e MF59 são adjuvantes preferidos para imunização parenteral. Mutantes de toxina são adjuvantes de mucosa preferidos. QS21 é um outro adjuvante útil para NMB1870, que pode ser usado isoladamente ou em combinação com um ou mais de outros adjuvantes, por exemplo, com um sal de alumínio.

Muramyl peptídeos incluem N-acetil-muramyl-L-treonil-

D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilnormuramil-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.

#### 5 Componentes antigênicos adicionais

As composições da invenção incluem seqüências de NMB1870. É particularmente preferível que a composição não inclua misturas complexas ou indefinidas de antígenos, por exemplo, é preferível não incluir vesículas de membrana externa na composição. Polipeptídeos da invenção são preferivelmente expressos recombinantemente em um hospedeiro heterólogo e então purificados.

Além de incluir uma seqüência de NMB 1870, a composição da invenção pode também incluir um ou mais antígeno(s) de Neisseria adicionais, como uma vacina que visa mais de um antígeno por bactéria, diminui a possibilidade de seleção de mutantes de escape. Antígenos de Neisseria para inclusão nas composições incluem polipeptídeos que compreendem um ou mais de:

20 (a) os 446 Ids. de Seq. pares (ou seja 2, 4, 6, ... , 890, 892) revelados na referência 89.

(b) os 45 Ids. de Seq. pares (ou seja 2, 4, 6, ... , 88, 90) revelados na referência 90;

(c) os 1.674 Ids. de Seq. pares 2-3.020, Ids. de Seq. 25 pares 3.040-3.114, e todos os Ids. de Seq. 3.115-3.241, revelados na referência 3;

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

(e) uma proteína meningocócica PorA, de qualquer 30 subtipo, preferivelmente recombinantemente expressa;

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

(g) uma preparação de vesícula de membrana externa de *N. meningitidis* [por exemplo, veja a ref. 182].

5 Além dos antígenos de polipeptídeo de Neisseria, a composição pode incluir antígenos para imunização contra outras doenças ou infecções. Por exemplo, a composição pode incluir um ou mais dos seguintes antígenos adicionais:

- um antígeno sacarídeo de sorogrupo A, C, W135  
10 e/ou Y de *N. meningitidis*, como o oligossacarídeo revelado na ref. 91 do sorogrupo C [veja também ref. 92] ou os oligossacarídeos da ref. 93.

- um antígeno sacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* [por exemplo, 94, 95, 96].

15 - um antígeno de vírus da hepatite A, como um vírus inativado [por exemplo, 97, 98].

- um antígeno do vírus da hepatite B, como os antígenos de superfície e/ou núcleo [por exemplo, 98, 99].

- um antígeno de difteria, como um toxóide diftérico  
20 [por exemplo, capítulo 3 da ref. 100], por exemplo, o mutante CRM197 [por exemplo, 101].

- um antígeno de tétano, como um toxóide tetânico [por exemplo, capítulo 4 da ref. 100].

- um antígeno de *Bordetella pertussis*, como  
25 holotoxina de pertussis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou aglutinogênios 2 e 3 [por exemplo, refs. 102 & 103].

- um antígeno sacarídeo de *Haemophilus influenzae* B  
30 [por exemplo, 92].

- antígeno(s) da pólio [por exemplo, 104, 105] como IPV.

- antígenos de sarampo, caxumbas e/ou rubéola [por exemplo, capítulos 9, 10 & 11 da ref. 100].

5 - antígeno(s) de influenza [por exemplo, capítulo 19 da ref. 100], como a hemaglutinina e/ou proteínas de superfície de neuraminidase.

- um antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por exemplo, 106].

10 - um antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (streptococcus de grupo B) [por exemplo, 107, 108].

- um antígeno sacarídeo de *Streptococcus agalactiae* (streptococcus de grupo B).

15 - um antígeno de *Streptococcus pyogenes* (streptococcus de grupo A) [por exemplo, 108, 109, 110].

- um antígeno de *Staphylococcus aureus* [por exemplo, 111].

20 A composição pode compreender um ou mais desses antígenos adicionais.

Antígenos de proteína tóxicos podem ser desintoxicados quando necessário (por exemplo, desintoxicação de toxina de pertussis por meios químicos e/ou genéticos [103]).

25 Quando um antígeno diftérico é incluído na composição, é preferível também incluir antígeno tetânico e antígenos de pertussis. De modo similar, quando um antígeno tetânico é incluído, é preferível também incluir antígeno diftérico e antígenos de pertussis. De modo similar, quando um antígeno de pertussis é incluído, é preferível também  
30 incluir antígeno diftérico e antígeno tetânico. Combinações

de DTP são assim preferidas.

Antígenos sacarídeos estão preferivelmente na forma de conjugados. Proteínas transportadoras para os conjugados são discutidas em maiores detalhes abaixo.

5 Antígenos em uma composição estarão tipicamente presentes em uma concentração de pelo menos 1 µg/ml cada. Em geral, a concentração de qualquer antígeno dado será suficiente para despertar uma resposta imune contra aquele antígeno.

10 Composições imunogênicas da invenção podem ser usadas terapeuticamente (ou seja, para tratar uma infecção existente) ou profilaticamente (ou seja, para prevenir futura infecção).

Como uma alternativa ao uso de antígenos de proteínas nas composições imunogênicas da invenção, ácido nucléico (preferivelmente DNA, por exemplo, na forma de um plasmídeo) que codifica o antígeno pode ser usado.

15 Composições particularmente preferidas da invenção incluem um, dois ou três de: (a) antígenos sacarídeos de meningococos sorogrupos Y, W135, C e (opcionalmente) A; (b) um antígeno sacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo B; e/ou (c) um antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.

#### **Meningococo sorogrupos Y, W135, C e (opcionalmente) A**

25 Vacinas de polissacarídeo contra sorogrupos A, C, W135 & Y são conhecidas por vários anos. Essas vacinas (MENCEVAX ACWY™ e MENOMUNE™) são baseadas nos polissacarídeos capsulares do organismo e, embora elas sejam eficazes em adolescentes e adultos, elas dão uma resposta imune pobre e de curta duração de proteção, e elas não podem ser usadas em bebês.

30

Em contraste aos antígenos polissacarídeos não conjugados nessas vacinas, as vacinas de sorogrupo C recentemente aprovadas (Menjugate™ [112,91], Meningitec™ e NeisVac-C™) incluem sacarídeos conjugados. Menjugate™ e 5 Meningitec™ têm antígenos de oligossacarídeo conjugados um veículo CRM197, enquanto NeisVac-C™ usa o polissacarídeo completo (de-O-acetilado) conjugado a um veículo de toxóide tetânico. A vacina Menactra™ contém antígenos sacarídeos capsulares conjugados de cada um dos sorogrupos Y, W135, C 10 e A.

As composições da presente invenção incluem preferivelmente antígenos sacarídeos capsulares de um ou mais dos sorogrupos meningocócicos Y, W135, C e (opcionalmente) A, em que os antígenos são conjugados a 15 proteína(s) transportadoras e/ou são oligossacarídeos. Por exemplo, a composição pode incluir um antígeno sacarídeo capsular de: sorogrupo C; sorogrupos A e C; sorogrupos A, C e W135; sorogrupos A, C e Y; sorogrupos C, W135 e Y; ou de todos os quatro sorogrupos A, C, W135 e Y.

20 Uma quantidade típica de cada antígeno sacarídeo meningocócico por dose é entre 1 µg e 20 µg, por exemplo, cerca de 1 µg, cerca de 2,5 µg, cerca de 4 µg, cerca de 5 µg, ou cerca de 10 µg (expresso como sacarídeo).

Quando uma mistura compreende sacarídeos capsulares de 25 ambos os sorogrupos A e C, a proporção (p/p) de sacarídeo MenA:sacarídeo MenC pode ser maior que 1 (por exemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou maior).

Quando uma mistura compreende sacarídeos capsulares de sorogrupo Y e um ou ambos de sorogrupos C e W135, a 30 proporção (p/p) de sacarídeo MenY:sacarídeo MenW135 pode

ser maior que 1 (por exemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou maior) e/ou aquela proporção (p/p) de sacarídeo MenY:sacarídeo MenC pode ser de menos que 1 (por exemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, ou menor). Proporções preferidas (p/p) para sacarídeos de sorogrupos A:C:W135:Y são: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; e 2:2:2:1. Proporções preferidas (p/p) para sacarídeos de sorogrupos C:W135:Y são: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1; e 2:1:1. O uso de uma massa substancialmente igual de cada sacarídeo é preferido.

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

A fragmentação de polissacarídeos é preferivelmente realizada em um grau médio final de polimerização (DP) no oligossacarídeo de menos que 30 (por exemplo, entre 10 e 20, preferivelmente por volta de 10 para sorogrupo A; entre 15 e 25 para sorogrupos W135 e Y, preferivelmente por volta de 15-20; entre 12 e 22 para sorogrupo C etc.). DP pode convenientemente ser medido por cromatografia de troca iônica ou por ensaios colorimétricos [113].

Se a hidrólise é realizada, o hidrolisado será geralmente dimensionado para remover oligossacarídeos de comprimento curto [92]. Isso pode ser realizado de várias formas, como ultrafiltração seguida por cromatografia de troca iônica. Oligossacarídeos com um grau de polimerização de menos que ou igual a cerca de 6 são preferivelmente

removidos para sorogrupo A, e aqueles com menos que por volta de 4 são preferivelmente removidos para sorogrupos W135 e Y.

Antígenos sacarídeos MenC preferidos são revelados na referênciã 112, como usado em Menjugate™.

O antígeno sacarídeo pode ser quimicamente modificado. Isso é particularmente útil para reduzir a hidrólise para sorogrupo A [114; veja abaixo]. De-O-acetilação de sacarídeos meningocócicos pode ser realizada. Para oligossacarídeos, a modificação pode ocorrer antes ou depois da despolimerização.

Quando uma composição da invenção inclui um antígeno sacarídeo de MenA, o antígeno é preferivelmente um sacarídeo modificado em que um ou mais dos grupos hidroxil no sacarídeo nativo foram substituídos por um grupo de bloqueio [114]. Essa modificação melhora a resistência à hidrólise.

Polissacarídeos capsulares meningocócicos são tipicamente preparados por um processo que compreende as etapas de precipitação de polissacarídeo (por exemplo, usando um detergente catiônico), fracionamento de etanol, extração de fenol frio (para remover proteína) e ultracentrifugação (para remover LPS) [por exemplo, ref. 115]. Um processo mais preferido [93], no entanto, envolve a precipitação de polissacarídeo seguida por solubilização do polissacarídeo precipitado com o uso de um álcool inferior. A precipitação pode ser realizada com o uso de um detergente catiônico como tetrabutílamônio e sais de cetiltrimetilamônio (por exemplo, os sais de brometo), ou brometo de hexadimetrina e sais de miristiltrimetilamônio.



Brometo de cetiltrimetilamônio ('CTAB') é particularmente preferido [116]. A solubilização do material precipitado pode ser realizada com o uso de um álcool inferior como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 5 2-metilpropan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dióis etc., mas etanol é particularmente adequado para solubilização de complexos CTAB-polissacarídeo. Etanol é preferivelmente adicionado ao polissacarídeo precipitado para gerar uma concentração final (baseada no conteúdo total de etanol e 10 água) entre 50% e 95%.

Após a re-solubilização, o polissacarídeo pode ser também tratado para remover contaminantes. Isso é particularmente importante em situações em que mesmo uma menor contaminação não é aceitável (por exemplo, para 15 produção de vacina humana). Isso envolverá tipicamente uma ou mais etapas de filtração por exemplo, filtração profunda, filtração através de carbono ativado podem ser usadas, filtração por tamanho e/ou ultrafiltração. Uma vez filtrado para remover contaminantes, o polissacarídeo pode 20 ser precipitado para posterior tratamento e/ou processamento. Isso pode ser convenientemente realizado por troca de cátions (por exemplo, pela adição de sais de cálcio ou sódio).

Como uma alternativa à purificação, os sacarídeos 25 capsulares podem ser obtidos por síntese total ou parcial, por exemplo, síntese de Hib é revelada na ref. 117, e síntese de MenA na ref. 118.

As composições da invenção compreendem sacarídeos capsulares de pelo menos dois sorogrupos de *N.* 30 *meningitidis*. Os sacarídeos são preferivelmente preparados

separadamente (incluindo qualquer fragmentação, conjugação, modificação etc.) e então misturados para gerar a composição da invenção.

Quando a composição compreende sacarídeo capsular de sorogrupo A, no entanto, é preferível que o sacarídeo de sorogrupo A não seja combinado com o outro sacarídeo(s) até logo antes do uso, para minimizar o potencial para hidrólise. Isso pode ser convenientemente realizado tendo o componente do sorogrupo A (tipicamente junto com excipientes adequados) em forma liofilizada e os outros componentes do sorogrupo em forma líquida (também com excipientes adequados), com os componentes líquidos sendo usados para reconstituir o componente liofilizado de MenA quando pronto para uso. Quando um adjuvante de sal de alumínio é usado, é preferível incluir o adjuvante no frasco que o contém com a vacina líquida, e liofilizar o componente de MenA sem adjuvante.

Uma composição da invenção pode ser assim preparada a partir de um kit que compreende: (a) sacarídeo capsular de sorogrupo A de *N. meningitidis*, em forma liofilizada; e (b) os antígenos adicionais da composição, em forma líquida. A invenção também fornece um método para a preparação de uma composição da invenção, que compreende a mistura de um sacarídeo capsular liofilizado de *N. meningitidis* sorogrupo A com os antígenos adicionais, em que os referidos antígenos adicionais estão em forma líquida.

A invenção também fornece um kit que compreende: (a) um primeiro recipiente que contém sacarídeos capsulares de dois ou mais sorogrupos de *N. meningitidis* C, W135 e Y, todos em forma liofilizada; e (b) um segundo recipiente que

contém em forma líquida (i) uma composição que, após administração a um indivíduo, é capaz de induzir uma resposta de anticorpo naquele indivíduo, em que a resposta de anticorpo é bactericida contra duas ou mais (por exemplo, 2 ou 3) das linhagens hipervirulentas A4, ET-5 e 3 de *N. meningitidis* sorogrupo B, (ii) sacarídeos capsulares de nenhum ou um dos sorogrupos de *N. meningitidis* C, W135 e Y, e opcionalmente (iii) antígenos adicionais (veja abaixo) que não incluem sacarídeos capsulares meningocócicos, em que, a reconstituição dos conteúdos do recipiente (a) pelo conteúdo do recipiente (b) fornece a composição da invenção.

Em cada dose, a quantidade de um antígeno sacarídeo individual será geralmente entre 1-50 µg (medido como massa de sacarídeo), com cerca de 2,5 µg, 5 µg ou 10 µg de cada sendo preferido. Com proporções de peso de A:C:W135:Y de 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; e 2:2:2:1, portanto, a quantidade representada pelo número 1 é preferivelmente cerca de 2,5 µg, 5 µg ou 10 µg. Para uma proporção de 1:1:1:1 da composição A:C:W:Y e 10 µg por sacarídeo, portanto, 40 µg de sacarídeo é administrado por dose. Composições preferidas têm cerca de dos seguintes µg de sacarídeo por dose:

25

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

As composições preferidas da invenção compreendem menos que 50 µg de sacarídeo meningocócico por dose. Outras

30

composições preferidas compreendem  $\leq 40$   $\mu\text{g}$  de sacarídeo meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem  $\leq 30$   $\mu\text{g}$  de sacarídeo meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem  $\leq 25$   $\mu\text{g}$  de sacarídeo meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem  $\leq 20$   $\mu\text{g}$  de sacarídeo meningocócico por dose. Outras composições preferidas compreendem  $\leq 10$   $\mu\text{g}$  de sacarídeo meningocócico por dose mas, idealmente, as composições da invenção compreendem pelo menos 10  $\mu\text{g}$  de sacarídeo meningocócico por dose.

Os conjugados Menjugate™ e NeisVac™ MenC usam um adjuvante de hidróxido, enquanto Meningitec™ usa um fosfato. É possível em composições da invenção absorver alguns antígenos a um hidróxido de alumínio mas ter outros antígenos em associação com um fosfato de alumínio. Para combinações de sorogrupo tetravalentes, por exemplo, as seguintes permutas são disponíveis:

Sorogrupo	Sal de alumínio (H= um hidróxido; P= um fosfato)															
A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Para combinações de sorogrupo de *N. meningitidis* trivalentes, as seguintes permutas são disponíveis:

Sorogrupo	Sal de alumínio (H= um hidróxido; P= um fosfato)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

#### *Haemophilus influenzae* tipo B

Quando a composição inclui um antígeno de *H. influenzae* tipo b, ele será tipicamente um antígeno

sacarídeo capsular Hib. Antígenos sacarídeos de *H. influenzae* b são bem conhecidos.

Vantajosamente, o sacarídeo de Hib é covalentemente conjugado a uma proteína transportadora, para melhorar sua imunogenicidade, especialmente em crianças. A preparação de polissacarídeo conjugados em geral, e do polissacarídeo capsular de Hib em particular, é bem documentada [por exemplo, referências 119 a 127 etc.]. A invenção pode usar qualquer conjugado de Hib adequado. Proteínas transportadoras adequadas são descritas abaixo, e transportadores preferidos para sacarídeos de Hib são CRM197 ('HbOC'), toxóide tetânico ('PRP-T') e o complexo de membrana externa de *N. meningitidis* (PRP-OMP).

A porção sacarídea do conjugado pode ser um polissacarídeo (por exemplo, polirribosilribitol fosfato de comprimento total (PRP)), mas é preferível hidrolisar polissacarídeos para formar oligossacarídeos (por exemplo, peso molecular de ~1 a ~5 kDa).

Um conjugado preferido compreende um oligossacarídeo de Hib covalentemente ligado a CRM197 via um ligante de ácido adípico [128, 129]. O toxóide tetânico é também um veículo preferido.

As composições da invenção podem compreender mais de um antígeno de Hib.

Quando a composição inclui um antígeno sacarídeo de Hib, é preferível que ela não inclua também um adjuvante de hidróxido de alumínio. Se a composição inclui um adjuvante de fosfato de alumínio, então o antígeno de Hib pode ser adsorvido ao adjuvante [130] ou ele pode ser não adsorvido [131].

Antígenos de Hib podem ser liofilizados, por exemplo, junto com antígenos meningocócicos.

***Streptococcus pneumoniae***

Quando a composição inclui um antígeno de  
5 *S.pneumoniae*, ele será tipicamente um antígeno sacarídeo capsular que é preferivelmente conjugado a uma proteína transportadora [por exemplo, refs. 94-96]. É preferível incluir sacarídeos de mais de um sorotipo de *S.pneumoniae*. Por exemplo, misturas de polissacarídeos de 23 diferentes  
10 sorotipos são amplamente usadas, como são vacinas conjugadas com polissacarídeos de entre 5 e 11 diferentes sorotipos [132]. Por exemplo, PrevNar™ [133] contém antígenos de sete sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F) com cada sacarídeo individualmente conjugado a CRM197  
15 por aminação redutiva, com 2 µg de cada sacarídeo por dose de 0,5 ml de (4 µg de sorotipo 6B), e com conjugados adsorvidos em um adjuvante de fosfato de alumínio. As composições da invenção preferivelmente incluem pelo menos sorotipos 6B, 14, 19F e 23F. Os conjugados podem ser  
20 adsorvidos em fosfato de alumínio.

Como uma alternativa ao uso de antígeno sacarídeos para pneumococo, a composição pode incluir um ou mais antígenos de polipeptídeo. Seqüências genômicas para várias cepas de pneumococo são disponíveis [134,135] e podem ser  
25 submetidas a vacinologia reversa [136-139] para identificar antígenos adequados de polipeptídeo [140,141]. Por exemplo, a composição pode incluir um ou mais dos seguintes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128 e Sp130, como definido na referência  
30 142.

Em algumas modalidades, a composição pode incluir antígenos de sacarídeo e polipeptídeo de pneumococo. Esses podem ser usados em mistura simples, ou o antígeno sacarídeo pneumocócico pode ser conjugado a uma proteína pneumocócica. Proteínas transportadoras adequadas para tais modalidades incluem os antígenos listados nos parágrafos anteriores [142].

Antígenos pneumocócicos pode ser liofilizados, por exemplo, junto com antígenos meningocócicos e/ou de Hib.

#### 10 **Conjugação covalente**

Sacarídeos capsulares em composições da invenção serão comumente conjugados a proteínas transportadoras. Em geral, a conjugação aumenta a imunogenicidade dos sacarídeos uma vez que ela os converte de antígenos T-independentes a antígenos T-dependentes, assim permitindo a iniciação para memória imunológica. A conjugação é particularmente útil para vacinas pediátricas e é uma técnica bem conhecida [por exemplo, revista nas refs. 143 e 119-127].

Proteínas transportadoras preferidas são toxinas bacterianas ou toxóides, como toxóide diftérico ou toxóide tetânico. A toxina diftérica de mutante CRM197 [144,145,146] é particularmente preferida. Outras proteínas transportadoras adequadas incluem a proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [147], peptídeos sintéticos [148,149], proteínas *heat shock* [150,151], proteínas de pertussis [152,153], proteína D de *H. influenzae* [154,155], citocinas [156], linfocinas [156], proteínas artificiais que compreendem múltiplos epitopos de célula T humana CD4+ de vários antígenos derivados de patógeno [157], proteínas estreptocócicas, hormônios [156], fatores de crescimento

[156], proteína de superfície pneumocócica PspA [158], toxina A ou B de *C.difficile* [159], proteínas de retenção de ferro [160] etc. Uma proteína transportadora preferida é CRM197.

5 Na composição da invenção, é possível usar mais de uma proteína transportadora, por exemplo, para reduzir o risco de supressão de transportador. Portanto, diferentes proteínas transportadoras podem ser usadas para diferentes sorogrupos, por exemplo, sacarídeos de sorogrupo A devem  
10 ser conjugados a CRM197 enquanto sacarídeos de sorogrupo C devem ser conjugados a toxóide tetânico. É também possível usar mais de uma proteína transportadora para um antígeno sacarídeo particular, por exemplo, sacarídeos de sorogrupo A devem estar em dois grupos, com alguns conjugados a  
15 CRM197 e outros conjugados ao toxóide tetânico. Em geral, no entanto, é preferível usar a mesma proteína transportadora para todos os sacarídeos.

Uma única proteína transportadora deve carregar mais de um antígeno sacarídeo [161]. Por exemplo, uma única  
20 proteína transportadora deve ter conjugados a ela sacarídeos de sorogrupos A e C. Para atingir esse objetivo, os sacarídeos podem ser misturados antes da reação de conjugação. Em geral, no entanto, é preferível ter conjugados separados para cada sorogrupo.

25 Os conjugados com uma proporção de sacarídeo:proteína (p/p) entre 1:5 (ou seja excesso de proteína) e 5:1 (ou seja excesso de sacarídeo) são preferidos. Proporções entre 1:2 e 5:1 são preferidas, assim como proporções entre 1:1,25 e 1:2,5 são mais preferidas. Excesso de proteína  
30 transportadora é preferido para MenA e MenC.



Os conjugados podem ser usados junto com proteína transportadora livre [162]. Quando uma dada proteína transportadora está presente tanto na forma livre e quanto na conjugada em uma composição da invenção, a forma não conjugada é preferivelmente não mais de 5% da quantidade total da proteína transportadora na composição como um todo, e mais preferivelmente presente em menos que 2% em peso.

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

O sacarídeo será tipicamente ativado ou funcionalizado antes da conjugação. A ativação pode envolver, por exemplo, reagentes de cianilação como CDAP (por exemplo, 1-ciano-4-dimetilamino piridínio tetrafluorborato [163,164,etc.]). Outras técnicas adequadas usam carbodiimidas, hidrazidas, ésteres ativos, norborano, ácido p-nitrobenzóico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; veja também a introdução à referência 125).

As ligações por meio de um grupo ligante podem ser feitas com o uso de qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos descritos nas referências 165 e 166. Um tipo de ligação envolve a aminação reductiva do polissacarídeo, ligação do grupo amino resultante com uma extremidade de um grupo ligante de ácido adípico, e então ligação de uma proteína a outra extremidade do grupo ligante de ácido adípico [123,167,168]. Outros ligantes incluem B-propionamido [169], nitrofenil-etilamina [170], haloacil haletos [171], ligações glicosídicas [172], ácido 6-aminocapróico [173], ADH [174], porções C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [175] etc. Como uma alternativa ao uso de um ligante, a ligação

direta pode ser usada. Ligações diretas à proteína podem compreender oxidação do polissacarídeo seguida por aminação redutiva com a proteína, como descrito, por exemplo, nas referências 176 e 177.

5 Um processo que envolve a introdução de grupos amino no sacarídeo (por exemplo, por substituição de grupos terminal =O com -NH<sub>2</sub>) seguida por derivatização com um diéster adípico (por exemplo, ácido adípico N-hidroxisuccinimido diéster) e reação com proteína  
10 transportadora é preferido. Uma outra reação preferida usa ativação de CDAP com uma proteína D transportadora, por exemplo, para MenA ou MenC.

Depois da conjugação, sacarídeos livres e conjugados podem ser separados. Há vários métodos adequados, incluindo  
15 cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração etc. [veja também refs. 178 & 179, etc.].

Quando uma composição da invenção inclui um conjugado oligossacarídeo, é preferível que a preparação de oligossacarídeo preceda a conjugação.

## 20 **Vesículas de membrana externa**

É preferível que as composições da invenção não incluam misturas complexas ou indefinidas de antígenos, que são características típicas de OMVs. entretanto, a invenção pode ser usada junto com OMVs, uma vez que NMB1870 melhora  
25 sua eficácia [6], em particular por superexpressão dos polipeptídeos da invenção nas cepas usadas para preparação de OMV.

Essa abordagem pode ser usada em geral para melhorar as preparações de microvesículas de *N. meningitidis*  
30 sorogrupo B [180], 'OMVs nativas' [181], vesículas de

membrana externa [por exemplo, refs. 182 a 187 etc.]. Essas podem ser preparadas a partir de bactérias que foram geneticamente manipuladas [188-191] por exemplo, para aumentar a imunogenicidade (por exemplo, hiperexpressão de 5 imunógenos), para reduzir a toxicidade, para inibir a síntese de polissacarídeo capsular, para infra-regular a expressão de PorA etc. Elas podem ser preparadas a partir de cepas hiperbolhosas [192-195]. Vesículas de uma Neisseria não patogênica podem ser incluídas [196]. OMVs 10 podem ser preparadas sem o uso de detergentes [197,198]. Elas podem expressar proteínas não-Neisseria 1 na sua superfície [199]. Elas podem ser esvaziadas de LPS. Elas podem ser misturadas com antígenos recombinantes [182,200]. As vesículas de bactérias com diferentes subtipos de 15 proteína de membrana externa de classe I podem ser usadas, por exemplo, seis diferentes subtipos [201,202] com o uso de duas diferentes populações de vesículas geneticamente-construídas cada uma mostrando três subtipos, ou nove diferentes subtipos usando três diferentes populações de 20 vesículas geneticamente-construídas cada uma mostrando três subtipos etc. Subtipos úteis incluem: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1; P1.18-1,3,6.

#### **Expressão de proteína**

25 Técnicas de expressão de bactérias são conhecidas na técnica. Um promotor bacteriano é qualquer seqüência de DNA capaz de ligar RNA polimerase bacteriana e de iniciar a transcrição abaixo (3') de uma seqüência codificadora (por exemplo, gene estrutural) em mRNA. Um promoter terá uma 30 região de iniciação de transcrição que é comumente colocada

próxima à extremidade 5' da seqüência codificadora. Essa região de iniciação de transcrição comumente inclui um sítio de ligação de RNA polimerase e um sítio de iniciação de transcrição. Um promotor bacteriano também pode ter um  
5 segundo domínio chamado um operador, que pode sobrepor uma sítio de ligação de RNA polimerase adjacente em que a síntese de RNA se inicia. O operador permite transcrição negativa regulada (indutível), como uma proteína repressora de gene pode ser ligar ao operador e assim inibir a  
10 transcrição de um gene específico. A expressão constitutiva pode ocorrer na ausência de elementos reguladores negativos, como o operador. Além disso, regulação positiva pode ser realizada por uma seqüência de ligação de proteína ativadora de gene, que, se presente é comumente próxima  
15 (5') à seqüência de ligação de RNA polimerase. Um exemplo de uma proteína ativadora de gene é a proteína ativadora de catabólito (CAP), que ajuda a iniciar a transcrição do óperon lac em *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud e cols. (1984) Annu. Rev. Genet. 18:173]. A expressão regulada pode  
20 ser assim positiva ou negativa, desse modo aumentando ou reduzindo a transcrição.

Seqüências que codificam enzimas de via metabólica fornecem seqüências promotoras particularmente úteis. Exemplos incluem seqüências promotoras derivadas de enzimas  
25 de metabolização de açúcar, como galactose, lactose (lac) [Chang e cols. (1977) Nature 198:1056], e maltose. Exemplos adicionais incluem seqüências promotoras derivada de enzimas biossintéticas como triptofano (*trp*) [Goeddel e cols. (1980) Nuc. Acids Res. 8:4057; Yelverton e cols.  
30 (1981) Nucl Acids Res. 9:731; patente U.S. 4.738.921; EP-A-

0036776 e EP-A-0121775]. O sistema promotor (3-lactamase (bla) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." Em Interferon 3 (ed. I. Gresser)], bacteriófago lambda PL [Shimatake e cols. (1981) Nature 5 292:128] e sistemas promotores T5 [patente U.S. 4.689.406] também fornecem seqüências promotoras úteis. Um outro promotor de interesse é um promotor de arabinose indutível (pBAD).

Em adição, promotores sintéticos que não ocorrem na 10 natureza também funcionam como promotores bacterianos. Por exemplo, seqüências de ativação de transcrição de um promotor bacteriano ou bacteriófago podem ser unidas com as seqüências de óperon de um outro promotor bacteriano ou bacteriófago, criando um promotor híbrido sintético 15 [patente u.S. 4.551.433]. Por exemplo, o promotor tac é um promotor híbrido trp-lac que compreende o promotor trp e seqüências de óperon lac que é regulado pelo repressor de lac [Amann e cols. (1983) Gene 25:167; de Boer e cols. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:21]. Além disso, um 20 promotor bacteriano pode incluir promotores de ocorrência natural de origem não bacteriana que têm a capacidade de ligar RNA polimerase bacteriana e de iniciar a transcrição. Um promotor de ocorrência natural de origem não bacteriana também pode ser ligado com uma RNA polimerase compatível 25 para produzir altos níveis de expressão de alguns genes em procariotas. O sistema bacteriófago T7 RNA polimerase/promotor é um exemplo de um sistema de promotor ligado [Studier e cols. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; Tabor e cols. (1985) Proc Natl. Acad. Sci. 82:1074]. Além disso, 30 um promotor híbrido também pode compreender um promotor de

bacteriófago e uma região operadora de *E. coli* (EPO-A-0 267 851).

Em adição a uma seqüência promotora funcionante, um sítio de ligação de ribossomo eficiente é também útil para  
5 expressão de genes estranhos em procariotas. Em *E. coli*, o sítio de ligação de ribossomo é chamado a seqüência de Shine-Dalgarno (SD) e inclui um códon de iniciação (ATG) e uma seqüência de 3-9 nucleotídeos de comprimento localizada 3-11 nucleotídeos acima do códon de iniciação. A seqüência  
10 de SD promove a ligação de mRNA ao ribossomo pelo pareamento de bases entre a seqüência de SD e 3' de *E. coli* 16S rRNA [Steitz e cols. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequence in messenger RNA". Em Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. R.F. Goldberger)]. Para expressar genes eucariotas e procariotas  
15 com sítio de ligação de ribossomo fraco [Sambrook e cols. (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*". Em Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Uma seqüência promotora pode ser diretamente ligada  
20 com a molécula de DNA, em cujo caso o primeiro aminoácido no terminal N será sempre uma metionina, que é codificada pelo códon de iniciação ATG. Se desejado, a metionina no terminal N pode ser clivada da proteína por incubação *in vitro* com brometo de cianogênio ou por incubação *in vivo* ou  
25 *in vitro* com uma peptidase N-terminal de metionina bacteriana (EP-A-0219237).

Comumente, as seqüências de terminação de transcrição reconhecidas por bactérias são regiões reguladoras localizadas 3' ao códon de parada de tradução, e assim  
30 junto com o promotor flanqueiam a seqüência codificadora.

Essas seqüências direcionam a transcrição de um mRNA que pode ser traduzido no polipeptídeo codificado pelo DNA. As seqüências de terminação de transcrição freqüentemente incluem seqüências de DNA de cerca de 50 nucleotídeos  
5 capazes de formar estruturas de alça que ajudam na terminação da transcrição. Exemplos incluem seqüências de terminação de transcrição derivadas de genes com promotores fortes, como o gene *trp* em *E. coli* bem como outros genes biossintéticos.

10 Comumente, os componentes acima descritos, que compreendem um promotor, seqüência de sinal (se desejado), seqüência codificadora de interesse, e seqüência de terminação de transcrição, são colocados juntos em construções de expressão. As construções de expressão são  
15 freqüentemente mantidas em um replicon, como um elemento extracromossômico (por exemplo, plasmídeos) capazes de manutenção estável em um hospedeiro como bactéria. O replicon terá um sistema de replicação, assim permitindo que ele seja mantido em um hospedeiro procariótico para  
20 expressão ou para clonagem e amplificação. Além disso, um replicon pode ser um plasmídeo de alto ou baixo número de cópia. Um plasmídeo de alto número de cópia terá geralmente um número de cópia que varia de cerca de 5 a cerca de 200, e comumente de cerca de 10 a cerca de 150. um hospedeiro  
25 contendo um plasmídeo de alto número de cópia conterà preferivelmente pelo menos cerca de 10, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 20 plasmídeos. Um vetor de alto ou baixo número de cópia pode ser selecionado, dependendo do efeito do vetor e a da proteína estranha  
30 sobre o hospedeiro.

Alternativamente, as construções de expressão podem ser integradas no genoma bacteriano com um vetor de integração. Vetores de integração comumente contêm pelo menos uma seqüência homóloga ao cromossomo bacteriano que  
5 permite que o vetor se integre. As integrações parecem resultar de recombinações entre DNA homólogo no vetor e o cromossomo bacteriano. Por exemplo, vetores de integração  
construídos com DNA de várias cepas de *Bacillus* se integram no cromossomo do *Bacillus* (EP-A-0127328). Vetores de  
10 integração também podem compreender seqüências de bacteriófago ou transpóson.

Comumente, construções de expressão extracromossômicas e de integração podem conter marcadores selecionáveis para permitir a seleção de cepas bacterianas que foram  
15 transformadas. Marcadores selecionáveis podem ser expressos no hospedeiro bacteriano e podem incluir genes que tornam a bactéria resistente a medicamentos como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina), e tetraciclina [Davies e cols. (1978) Annu. Rev. Microbiol.  
20 32:469]. Marcadores selecionáveis também podem incluir genes biossintéticos, como aqueles nas vias biossintéticas de histidina, triptofano, e leucina.

Alternativamente, alguns dos componentes acima descritos podem ser colocados juntos em vetores de  
25 transformação. Os vetores de transformação comumente compreendem um marcador selecionável que é mantido em um replicon ou desenvolvido em um vetor de integração, como acima descrito.

Vetores de expressão e transformação, réplicons  
30 extracromossômicos ou vetores de integração, foram



desenvolvidos para transformação em várias bactérias. Por exemplo, vetores de expressão foram desenvolvidos para, entre outras, as seguintes bactérias: *Bacillus subtilis* [Palva e cols. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP-A-0 036 259 e EP-A-0 063 953; WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake e cols. (1981) Nature 292:128; Amann e cols. (1985) Gene 40:183; Studier e cols. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 e EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell e cols. (1988) Appl Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powell e cols. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655], *Streptomyces lividans* [patente U.S. 4.745.056].

Métodos de introdução de DNA exógeno em hospedeiros bacterianos são bem conhecidos na técnica, e comumente incluem a transformação de bactérias tratadas com  $\text{CaCl}_2$  ou outros agentes, como cátions divalentes e DMSO. DNA pode também ser introduzido em células bacterianas por eletroporação. Os procedimentos de transformação comumente variam com a espécie bacteriana a ser transformada. Veja, por exemplo, [Masson e cols. (1989) FEMS Microbiol Lett. 60:273; Palva e cols. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP-A-0 036 259 e EP-A-0 063 953; WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller e cols. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang e cols. (1990) J. Bacteriol. / 72:949, *Campylobacter*], [Cohen e cols. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower e cols. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with CoIE1 -derived plasmids. In Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W.

Boyer e S. Nicosia); Mandel e cols. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*], [Chassy e cols. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler e cols. (1988) Anal. Biochem 170:38, *Pseudomonas*]; [Augustin e cols. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, *Staphylococcus*], [Barany e cols. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, in: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti e R. Curtiss III); Perry e cols. (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell e cols. (1988) Appl Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti e cols. (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1:412, *Streptococcus*].

#### Geral

15 O termo "que compreende" engloba "que inclui" bem como "que consiste", por exemplo, uma composição "que compreende" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

O termo "cerca de" em relação a um valor numérico x 20 significa, por exemplo, x+10%.

A palavra "substancialmente" não exclui "completamente", por exemplo, a composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Quando necessários, a palavra "substancialmente" pode 25 ser omitida da definição da invenção.

"Identidade de seqüência" é preferivelmente determinada pelo algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman como implementado no programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando pesquisa de "affine gap" com parâmetros 30 *gap open penalty* = 12 e *gap extension penalty* = 1.

Depois do sorogrupo, a classificação meningocócica inclui sorotipo, soro-subtipo e então imunotipo, e a nomenclatura padrão lista sorogrupo, sorotipo, soro-subtipo, e imunotipo, cada um separado por dois pontos, por exemplo, B:4:P1.15:L3,7,9. No sorogrupo B, algumas linhagens causam doença freqüentemente (hiperinvasivas), algumas linhagens causam formas mais severas da doença que outras (hipervirulentas), e outras raramente causam doença em geral. Sete linhagens hipervirulentas são reconhecidas, ou seja, subgrupos I, III e Iv-1, ET-5 complexo, ET-37 complexo, grupo A4 e linhagem 3. Essas foram definidas por eletroforese de enzima de multilocus (MLEE), mas a tipagem de seqüência de multilocus (MLST) também foi usada para classificar meningococos [ref. 18]. Os quatro grupos hipervirulentos principais são complexos ST32, ST44, ST8 e ST11.

Em geral, a invenção não engloba as várias seqüências de NMB1870 especificamente reveladas nas referências 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 203, embora essas seqüências de NMB1870 possam ser usadas de acordo com a invenção, por exemplo, para a construção de seqüências quiméricas etc.

#### **Modos de realizar a invenção**

##### **Substituições**

Id. de Seq. N°: 59 é revelado na referência 13 como uma quimera de NMB1870 das famílias I, II & III. Esse polipeptídeo é derivado por substituições em sete regiões de Id. de Seq. N°:1, identificadas abaixo:

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLEK  
 LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQ  
 IQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYSIDFAAKQNG  
 KIEHLKSPELNVDLPAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNG

IRHIGLAAKQ

(Id. de Seq. N°: 1)

Embora essa quimera despertasse anticorpos que foram bactericidas contra meningococos de cada família de NMB 1870, respostas contra cepas de família II e família III  
5 não foram consistentemente altas.

Por combinação de várias abordagens, incluindo uma estrutura 3D derivada de NMR do domínio BC de um polipeptídeo de família I, os inventores descobriram que os resíduos 162-168 (segunda região sublinhada) são  
10 circundados por um remendo de aminoácidos que são conservados entre MC58 meningocócico (família I) e 2996 (família II). Portanto, a substituição criou uma extensiva área semelhante a 2996 na superfície do polipeptídeo MC58, que pode explicar porque quimeras que incluem essa  
15 substituição podem despertar uma resposta bactericida contra as cepas da família II.

A substituição na terceira região sublinhada (ProAsn em vez de AlaGly) provavelmente alterou a conformação local da estrutura, introduzindo um alto grau de rigidez que  
20 alterou a dobra do polipeptídeo e reduziu a atividade bactericida.

Com base em uma comparação de (i) alinhamentos de seqüência na família II, e (ii) reatividade cruzada sérica intra-família, vários resíduos de aminoácido foram  
25 identificados que podem melhorar a capacidade de uma quimera de despertar uma boa resposta anti-II. Esses resíduos são: (a) superfície-exposto, baseado na estrutura de NMR, e assim são imuno acessíveis; (b) conservados com nas cepas da família II que não foram mortas por soro anti-  
30 2996; e (c) não no bolso hidrofóbico da proteína. Numerados

de acordo com Id. de Seq. N°:2, esses resíduos eram: D121; D165; A180; G181; K183; T185; T187; A191; A192; H196; K198; A213; S234; e G261. Exceto por D121 e D165, cada um desses resíduos foi conservado em três cepas que foram resistentes a anti-soro que surgiu contra a seqüência 2996. D121 é N em uma das três cepas, e D165 é S em duas das três cepas.

Portanto, Id. de Seq. N°:57 foi alterados para gerar Id. de Seq. N°: 60, que foi presente como parte de uma seqüência de NMB1870 de comprimento total.

A seqüência KLPEGGR 7-mer (Id. de Seq. N°:61) em Id. de Seq. N°: 57 foi substituída com QLPDGK 6-mer (Id. de Seq. N°:62). Assim, um aminoácido é deletado. Dependendo de como essas duas seqüências são alinhadas então o resíduo deletado pode ser identificado como E51, G52, G53 ou R54. O resultado final não depende de qual resíduo é nominalmente dito como sendo deletado mas, com base no alinhamento na referência 4, o resíduo deletado é melhor descrito como E51.

#### **Polipeptídeos tandem**

Como descrito na referência 12, um triplo-tandem de todas as três famílias de NMB 1870 foi preparado com as três famílias ordenadas do terminal N ao terminal C. Com ou sem um rótulo de a histidina C-terminal, esse polipeptídeo despertou respostas imunes que foram excelentes contra meningococos que têm um NMB 1870 nas famílias I e III (títulos séricos bactericidas  $\geq 1:128$  foram tipicamente observados contra 100% de cepas testadas), mas as respostas foram mais fracas contra cepas na família II de NMB1870 (títulos  $\geq 1:128$  tipicamente observados contra 60% de cepas testadas). Em particular, as respostas foram menores quando

do uso de polipeptídeo tandem que quando do uso de uma  
mistura das três proteínas separadas. Em contraste, um II-  
III tandem deu bom resultados, assim a seqüência da família  
II não é inerentemente incompatível com a abordagem de  
5 expressão tandem.

As respostas contra famílias I e II são importantes,  
mas as cepas da família III são relativamente raras. Para  
melhorar a eficácia contra cepas da família II, três  
abordagens foram agora usadas: (a) a ordem das famílias foi  
10 alterada, para ser II-III-I ou (b) seqüência da família  
III foi omitida e as famílias I e II foram expressas como  
I-II ou como II-I; ou (c) famílias I e II foram expressas  
abaixo de uma "seqüência de proteína 936, como 936-I-II ou  
as 936-II-I. Esses polipeptídeos foram expressos com vários  
15 ligantes, líderes etc., e com/sem um rótulo C-terminal  
poli-His.

Modalidades dessas três abordagens são dadas como Id.  
de Seq. N°S: 27 a 38:

Id. Seq.	Descrição		Id. Seq.	Descrição
27	II-I-His <sub>6</sub>		33	II-I
28	936-I-II-His <sub>6</sub>		34	936-I-II
29	936-II-I-His <sub>6</sub>		35	936-II-I
30	II-I-III-His <sub>6</sub>		36	II-III-I
31	II-III-I-His <sub>6</sub>		37	II-I-III

Essa proteínas foram usadas para imunizar camundongos.  
Diferentes adjuvantes foram testados, incluindo adjuvante  
completo de Freund, um adjuvante de hidróxido de alumínio,  
emulsão óleo em água MF59, e uma mistura de MF59 e um  
oligonucleotídeo imunoestimulante. Soros de camundongos  
30 foram testados em ensaios bactericidas.

Em geral, Id. de Seq. N°s: 28 e 29 foram igualmente eficazes. Id. de Seq. N°: 34 algumas vezes mostrou melhor atividade que Id. de Seq. N°: 28. Para as proteínas incluindo todas as três famílias, os melhores resultados foram geralmente observados com Id. de Seq. N°: 37.

### Seqüências da Família II

5 diferentes cepas na família II de NMB1870 foram selecionadas: M3153, M00-0243143; 1000, NGH38 e M0579. Os seguintes iniciadores foram usados para amplificar fragmentos para inserção nos sítios NdeI/XhoI de um vetor de expressão pET de *E. coli*. As seqüências foram amplificadas como seqüências AG; nas seqüências "chim $\Delta$ G", o iniciador adicionou Id. de Seq. N°: 66 ao terminal N. Iniciadores adiante forneceram um sítio NdeI; Iniciadores reversos forneceram um sítio XhoI.

CEPA		Id. de Seq. N°:	
		Adiante	Reverso
M3153	$\Delta$ G741	67	68
	chim $\Delta$ G741	69	70
M00-0243143	$\Delta$ G741	71	72
	chim $\Delta$ G741	73	74
1000	$\Delta$ G741	75	76
	chim $\Delta$ G741	77	78
NGH38	$\Delta$ G741	79	80
	chim $\Delta$ G741	81	82
M0579	$\Delta$ G741	83	84
	chim $\Delta$ G741	85	

### Novas seqüências de NMB1870

Informação de seqüência extensiva para NMB1870 é disponível [por exemplo, refs 4, 7, 8 e 10]. Além disso novas seqüências de NMB 1870 foram encontradas. Essas seqüências são Id. de Seq. N°s: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52,

53, 54, 55, 56, 63, 64, 65, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 e 94.

Soros que surge contra diferentes proteínas de NMB1870 foram testados contra cepa NM117. a atividade bactericida foi menor para o soro que surgiu contra proteínas nas famílias I, II ou III que para o soro homólogo. De modo similar, soro que surgiu contra a seqüência de NM117 teve atividade de SBA relativamente baixa contra cepas nas famílias de NMB1870 I, II ou III.

Deve-se compreender que a invenção é acima descrita por via de exemplo apenas e modificações podem ser feitas, embora permaneçam dentro do escopo e espírito da invenção.

**REFERÊNCIAS** (cujos conteúdos são aqui incorporado no total por referência)

- [1] Jodar e cols. (2002) Lancet 359(9316):1499-1508.
- [2] Pizza e cols. (2000) Science 287:1816-1820.
- [3] WO99/57280.
- [4] Massignani e cols. (2003) J Exp Med 197:789-799.
- [5] Welsch e cols. (2004) J immunol 172:5605-15.
- [6] Hou e cols. (2005) J Infect Dis 192(4):580-90.
- [7] WO03/063766.
- [8] Fletcher e cols. (2004) Infect Immun 72:2088-2100.
- [9] Zhu e cols. (2005) Infect Immun 73(10):6838-45.
- [10] WO01/64920.
- [11] WO03/020756.
- [12] WO2004/048404.
- [13] WO2006/024954.
- [14] Needleman & Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
- [15] Rice e cols. (2000) Trends Genet 16:276-277.
- [16] Achtman (1995) Global epidemiology of meningococcal



disease. Páginas 159-175 de Meningococcal disease (ed. Cartwright). ISBN: 0-471-95259-1.

[17] Caugant (1998) APMIS 106:505-525.

[18] Maiden e cols. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
5 95:3140-3145.

[19] WO01/30390.

[20] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of  
Pharmacy. 20ª edição, ISBN: 0683306472.

[21] WO03/009869.

10 [22] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN:  
030644867X. Plenum.

[23] WO00/23105.

[24] WO90/14837.

[25] Patente U.S. 5.057.540.

15 [26] WO96/33739.

[27] EP-A-0109942.

[28] WO96/11711.

[29] WO00/07621.

[30] Barr e cols. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews  
20 32:247-271.

[31] Sjolanderet e cols. (1998) Advanced Drug Delivery  
Reviews 32:321-338.

[32] Niikura e cols. (2002) Virology 293:273-280.

[33] Lenz e cols. (2001) J. Immunol 166:5346-5355.

25 [34] Pinto e cols. (2003) J Infect Dis 188:327-338.

[35] Gerber e cols. (2001) Virol 75:4752-4760.

[36] WO03/024480

[37] WO03/024481

[38] Gluck e cols. (2002) Vaccine 20:B10-B16.

30 [39] EP-A-0689454.

- [40] Johnson *e cols.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [41] Evans *e cols.* (2003) *Expert Rev Vaccinas* 2:219-229.
- [42] Meraldi *e cols.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- 5 [43] Pajak *e cols.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [44] Kandimalla *e cols.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [45] WO02/26757.
- [46] WO99/62923.
- 10 [47] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [48] McCluskie *e cols.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [49] WO98/40100.
- [50] Patente U.S. 6.207.646.
- 15 [51] Patente U.S. 6.239.116.
- [52] Patente U.S. 6.429.199.
- [53] Kandimalla *e cols.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [54] Blackwell *e cols.* (2003) *J. Immunol* 170:4061-4068.
- 20 [55] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [56] WO01/95935.
- [57] Kandimalla *e cols.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [58] Bhagat *e cols.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [59] WO03/035836.
- 25 [60] WO95/17211.
- [61] WO98/42375.
- [62] Beignon *e cols.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [63] Pizza *e cols.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [64] Pizza *e cols.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- 30 [65] Scharton-Kersten *e cols.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-

- 5313.
- [66] Ryan e cols. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
- [67] Partidos e cols. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
- [68] Peppoloni e cols. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-  
5 293.
- [69] Pine e cols. (2002) J Control Release 85:263-270.
- [70] Domenighini e cols. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
- [71] WO99/40936.
- [72] WO99/44636.
- 10 [73] Singh e cols. (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [74] WO99/27960.
- [75] Patente U.S. 6.090.406
- [76] Patente U.S. 5.916.588
- [77] EP-A-0626169.
- 15 [78] W099/52549.
- [79] WO01/21207.
- [80] WO01/21152.
- [81] Andrianov e cols. (1998) Biomateriais 19:109-115.
- [82] Payne e cols. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-  
20 196.
- [83] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [84] Jones (2003) C1217 Opin Investig Drugs 4:214-218.
- [85] WO99/11241.
- [86] WO94/00153.
- 25 [87] WO98/57659.
- [88] Pedidos de patente Européia 0835318, 0735898 e  
0761231.
- [89] WO99/24578.
- [90] WO99/36544.
- 30 [91] Costantino e cols. (1992) Vaccine 10:691-698.

- [92] Costantino e cols. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [93] WO03/007985.
- [94] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [95] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- 5 [96] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [97] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [98] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [99] Gerlich e cols. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [100] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-  
10 1946-0.
- [101] Del Giudice e cols. (1998) *Molecular Aspects of  
Medicine* 19:1-70.
- [102] Gustafsson e cols. (1996) *N. Engl. J. Med.*  
334:349-355.
- 15 [103] Rappuoli e cols. (1991) *TIBTECH*9:232-238.
- [104] Sutter e cols. (2000) *Pediatr Clin North Am*  
47:287-308.
- [105] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-  
118, 125-126.
- 20 [106] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [107] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- [108] WO02/34771.
- [109] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43,  
viii.
- 25 [110] Ferretti e cols. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [111] Kuroda e cols. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240;  
veja também páginas 1218-1219.
- [112] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [113] Ravenscroft et al (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- 30 [114] WO03/080678.

- [115] Frash (1990) p.123-145 of Advances in Biotechnological Processes vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [116] Inzana (1987) Infect. Immun. 55:1573-1579.
- 5 [117] Kandil e cols. (1997) Glycoconj J 14:13-17.
- [118] Berkin e cols. (2002) Chemistry 8:4424-4433.
- [119] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.
- [120] BATTERY & MOXON (2000) JR Coll Physicians Lond 34:163-168.
- 10 [121] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-33, vii.
- [122] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.
- [123] Patente européia 0477508.
- [124] Patente U.S. 5.306.492.
- 15 [125] WO98/42721.
- [126] Dick e cols. in Conjugate Vaccines (eds. Cruse e cols.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [127] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- 20 [128] Kanra e cols. (1999) The Turkish Journal of Paediatrics 42:421-427.
- [129] Ravenscroft e cols. (2000) Dev Biol (Basel) 103: 35-47.
- [130] WO97/00697.
- 25 [131] WO02/00249.
- [132] Zielen e cols. (2000) Infect. Immun. 68:1435-1440.
- [133] Darkes & Plosker (2002) Paediatr Drugs 4:609-630.
- [134] Tettelin e cols. (2001) Science 293:498-506.
- 30 [135] Hoskins et al (2001) J Bacteriol 183:5709-5717.

- [136] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
- [137] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.
- [138] Maignani et al (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
- 5 [139] Mora e cols. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- [140] Wizemann e cols. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [141] Rigden e cols. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.
- 10 [142] WO02/22167.
- [143] Ramsay e cols. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [144] Revelação de pesquisa, 453077 (Jan 2002)
- [145] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [146] Anderson e cols. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-15 59.
- [147] EP-A-0372501
- [148] EP-A-0378881
- [149] EP-A-0427347
- [150] WO93/17712
- 20 [151] WO94/03208
- [152] WO98/58668
- [153] EP-A-0471177
- [154] WO00/56360
- [155] EP-A-0594610.
- 25 [156] WO91/01146
- [157] Falugi e cols. (2001) *Eur J. Immunol* 31:3816-3824.
- [158] WO02/091998.
- [159] WO00/61761
- 30 [160] WO01/72337

- [161] WO99/42130
- [162] WO96/40242
- [163] Lees e cols. (1996) *Vacina* 14:190-198.
- [164] WO95/08348.
- 5 [165] Patente U.S. 4.882.317
- [166] Patente U.S. 4.695.624
- [167] Porro e cols. (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s
- [168] EP-A-0208375
- [169] WO00/10599
- 10 [170] Gever e cols. *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
- [171] Patente U.S. 4.057.685.
- [172] Patentes U.S. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [173] Patente U.S. 4.459.286.
- 15 [174] Patente U.S. 4.965.338
- [175] Patente U.S. 4.663.160.
- [176] Patente U.S. 4.761.283
- [177] Patente U.S. 4.356.170
- [178] Lei e cols. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- 20 [179] WO00/38711; Patente U.S. 6.146.902.
- [180] WO02/09643.
- [181] Katial e cols. (2002) *Infect Immun* 70:702-707.
- [182] WO01/52885.
- [183] patente Européia 0301992.
- 25 [184] Bjune e cols. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [185] Fukasawa e cols. (1999) *Vacina* 17:2951-2958.
- [186] WO02/09746.
- [187] Rosenqvist e cols. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- 30 [188] WO01/09350.

- [189] European patent 0449958.
- [190] EP-A-0996712.
- [191] EP-A-0680512.
- [192] WO02/062378.
- 5 [193] WO99/59625.
- [194] US patent 6,180,111.
- [195] WO01/34642.
- [196] WO03/051379.
- [197] Patente U.S. 6.558.677.
- 10 [198] WO2004/019977.
- [199] WO02/062380.
- [200] WO00/25811.
- [201] Peeters *e cols.* (1996) *Vacina* 14:1008-1015.
- [202] Vermont *e cols.* (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.
- 15 [203] WO2004/094596.

**Breve descrição da listagem de seqüência**

1	NMB1870 da cepa MC58 – família 1
2	NMB1870 das cepas 961-5945 & 2996 – família II
3	NMB1870 da cepa M1239 – família III
4-6	Domínios A to C de Id. de Seq. N°: 1
7-9	Domínios A to C de Id. de Seq. N°: 2
10-12	Domínios A to C de Id. de Seq. N°: 3
13	mature domínio A de Id. de Seq. N°: 4
14	Proteína 936
15-21	ligantes etc.
22-24	AG versões de Id. de Seq. N°s:1, 2 & 3
25	Truncated Id. de Seq. N°: 14
26	ligante
27-40	Híbridos & tandems



41-45	ligantes etc.
46-56	Formas polimórficas de NMB1870
57	Seqüência de referência para substituições
58-60	Seqüência quiméricas
61-62	Seqüências trocada em Id. de Seq. N°: 57
63-65	NMB1870 de várias cepas
66	Ligante
67-85	Iniciadores
86-94	NMB 1870 de várias cepas
95	AG forma de NMNB1870 da cepa nm117

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

**SEQ ID NO: 1** – cepa MC58 – familia I

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAZKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSCKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
 AQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 2** – cepas 961-5945 & 2996 - familia II

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAZKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA  
 KQHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 3** – cepa M1239 - familia III

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHRKDKGLKSLTLEDSIPQNGTILFLSAQGAZKTFKAGDKDNLNTGKLN  
 NDKISRFDFVQKIEVDGQITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNRGL  
 HYSIDFTKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 4** – domínio A de Id. de Seq. Nº: 1

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHRKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAZKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYK

**SEQ ID NO: 5** – domínio B de Id. de Seq. Nº: 1

QSHSALTAFTQEQIQDSEBSCKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGG

**SEQ ID NO: 6** – domínio C de Id. de Seq. Nº: 1

KLYTTIDFAAQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 7** – domínio A de Id. de Seq. Nº: 2

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHRKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAZKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYK

**SEQ ID NO: 8** – domínio B de Id. de Seq. Nº: 2

QDHSAVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGG

**SEQ ID NO: 9** – domínio C de Id. de Seq. Nº: 2

KLYTTIDFAAQNGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 10** – domínio A de Id. de Seq. Nº: 3

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHRKDKGLKSLTLEDSIPQNGTILFLSAQGAZKTFKAGDKDNLNTGKLN  
 NDKISRFDFVQKIEVDGQITLASGEFQIYK

**SEQ ID NO: 11** – domínio B de Id. de Seq. Nº: 3

QNHSAVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNRGL

**SEQ ID NO: 12** – domínio C de Id. de Seq. Nº: 3

RLHYSIDFTKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 13** – domínio A maduro de Id. de Seq. Nº: 4

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHRKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAZKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD FIRQIEVDGQLITLESGEF  
 QVYK

**SEQ ID NO: 14** – 936

MKPKPHTVRTLIAAIFSLALSGCVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETARSYLQRQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLILLCQVATE  
 GEKQFVGGIARSEQAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYVMGILTFEEQAQITQKVSTTVGVQKV  
 ITLYQNVVQR

**SEQ ID NO: 15**

GSGGGG

**SEQ ID NO: 16**

GGGG

**SEQ ID NO: 17**  
G?DSDRLQRR

**SEQ ID NO: 18**  
GSGPDSDRLQRR

**SEQ ID NO: 19**  
GKGPSDRLQRR

**SEQ ID NO: 20**  
HHHHH

**SEQ ID NO: 21**  
MGPESDRLQRR

**SEQ ID NO: 22** –cepa MC58 —familia I, AG  
VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH  
SALTAFQTEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNCKIEHLKSPELNVDLAAADIK  
PDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 23** –cepas 961-5945 & 2996 —familia II, AG  
VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDH  
SAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKA  
DEKSHAVILGDTTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 24** –cepa M1239 —familia III, AG  
VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTSAQGAETTFRAGDKNSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQITPLASGEFQIYK  
QNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKQGYGRIEHLKTPQONVELAAAE  
LKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 25**  
YSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVNYI  
TVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKVVITLYQNYVQR

**SEQ ID NO: 26**  
MAS

**SEQ ID NO: 27**  
NGPDSDRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL  
ESGEFQIYKQDHSVAVVALQIEKINNPDKIDSLINQSEFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP  
QONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKG  
LQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMWAK  
RQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNCKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSY  
SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQLEHHHHHH

**SEQ ID NO: 28**  
MASVAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVY  
NYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKVVITLYQNYVQRGSGGGVAAD  
IGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALT  
AFQTEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNCKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGK  
RHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGSEPSDRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQ  
SVRNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLG  
GGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGYHLALFGDRA  
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQLEHHHHHH

**SEQ ID NO: 29**  
MASVAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGVQIARSEQAAEGVY  
NYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPEEQAITQKVSTTVGVQKVVITLYQNYVQRGSGPDSDRLQ  
RRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYK  
QDHSVAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQONVELAAAE  
LKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQLEGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQ

VRKNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIA  
GEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRRAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKA  
QEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQLEHHHHHH

**SEQ ID NO: 30**

MGPDSDRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITL  
ESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKTP  
QNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGVVAADIGAGLADALTAPLDHKDKG  
LQSLTLDQSVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSGKMWAK  
RQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRRAVIGSVLYNQAEKGSY  
SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGSPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTF  
KAGDKNSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAE  
YHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQCYGRIEHLKTFEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVH  
EIGIAGKQKLEHHHHHH

**SEQ ID NO: 31**

MGPDSDRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITL  
ESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKTP  
QNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGSPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAP  
LDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN  
PDKTDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDENGRLEYSIDFTKKQCYGRIEHLKTFEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDR  
YGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGVVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLKLAACGAEK  
TYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRAT  
YRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRRAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR  
HIGLAAKQLEHHHHHH

**SEQ ID NO: 32**

MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQ  
HSALTAFTQEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIK  
PDGKRRAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGSPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQ  
SLTLDQSVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRS  
FLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLAL  
FGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGSPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGD  
KNSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPGGKAEYHGK  
AFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQCYGRIEHLKTFEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGI  
AGKQKLEHHHHHH

**SEQ ID NO: 33**

MGPDSDRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITL  
ESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKTP  
QNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGVVAADIGAGLADALTAPLDHKDKG  
LQSLTLDQSVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSGKMWAK  
RQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRRAVIGSVLYNQAEKGSY  
SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 34**

MASVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTGAQTDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLILLGQVATEGEEKQFVGQIARSEQAAEGVY  
NYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYMGILTPPEEQAITQKVESTTVGVQKVITLYQNYVQRSGGGVVAAD  
IGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALT  
AFTQEQIQDSEHSGKMWAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGK  
RAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGSPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQ  
SVRNEKLKLAACGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLG  
GGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRA  
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 35**

NASVSAVIGSMAVGAQSAVDRRTGAQTDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVQIARSEQAAEGVY  
NYITVASLERTAGDIAGDTWNTSEKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYVNGILTPPEQQAQITQKVSTTVGVQKVIITLQNYVYVQRSGPDSRDLQ  
QRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYK  
QDHSVAVLQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQONVELAAAE  
LKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKI GEKVHEIGIAGKQSGGGVVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLQSLTLDQS  
VRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMNVAKRQFRIGDIA  
GEETSFDKLEGGRTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKA  
QEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 36**

MGPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL  
ESSEGFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP  
QONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKI GEKVHEIGIAGKQSGPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAP  
LDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQGAEKTFKAGDKNSLNTGKLNKDKVSRFDFVQKIEVDGQITILASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN  
PDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTTKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDT  
YRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR  
HIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 37**

MGPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITL  
ESSEGFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP  
QONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKI GEKVHEIGIAGKQSGGGVVAADIGAGLADALTAPLDHKDKG  
LQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMNVA  
KRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSY  
SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQGAEKTF  
KAGDKNSLNTGKLNKDKVSRFDFVQKIEVDGQITILASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAE  
YHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTTKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKI GEKVH  
EIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 38**

MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQ  
HSALTAFQTEQIQDSEHSGKMNVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADI  
KPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQ  
LTLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDS LINQRS  
FLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTIYHLAL  
FGDRAQEIAGSATVKI GEKVHEIGIAGKQSGPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQGAEKTFKAGD  
KNSLNTGKLNKDKVSRFDFVQKIEVDGQITILASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGK  
AFSSDDPNRGLHYSIDFTTKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKI GEKVHEIGI  
AGKQ

**SEQ ID NO: 39**

MVAADIGAGLADALTALDHKDKLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSH  
SALTAFQTEQIQDSEHSGKMNVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKD  
KRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTALDHKDKGLKSLTLEDS  
IQNGTLTSAQGAEKTFKAGDKNSLNTGKLNKDKVSRFDFVQKIEVDGQITILASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLG  
GGEHTAFNQLGKAEYHGKAFSSDDNRLHYSIDFTTKQGYGRIEHLKTLQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTIYHLALFGDRAQ  
IAGSATVKI GEKVHEIGIAGKQSGPDSRDLQRRVAADIGAGLADALTALDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLN  
DKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVAVLQIEKINNDKIDS LINQRSFLVSLGGEHTAFNQLDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYT  
IDFAAKQGHGKIEHLKTEQONVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTIYHLALFGDRAQEIAGSATVKI GEKVHEIGIAGKQLEHHHHHH

**SEQ ID NO: 40**

MVAADIGAGLADALTAPLDHKDKLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQ  
HSALTAFQTEQIQDSEHSGKMNVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGRTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADI  
KPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGPDSRDLQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLK

LTLEDSIPQNGTLTLSAQGAETFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTTTLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKTDSLINO  
 RSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKQGYGRIEHLKTLPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYH  
 LALFGDRAQEIAGSATVKGIEKVHEIGIAGKQKGPDSRDLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQGAEKTYG  
 NGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPDGZAEYHGK  
 AFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKGIEKVHEIGI  
 AGKQ

**SEQ ID NO: 41**

LEHHHHH

**SEQ ID NO: 42**

KL

**SEQ ID NO: 43**

M

**SEQ ID NO: 44**

LE

**SEQ ID NO: 45**

LEGGGG

**SEQ ID NO: 46 - spo1061**

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNKELKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGRMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFSGDDAGGKLYTIDFA  
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 47 - spo1067**

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAETFKAGDKDNSLNTGKLN  
 NDKISRFDFVQKIEVDGQTTTLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGL  
 HYTIDFTNKQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKGIEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 48 - spo1160**

MNRTAFCCSLTAAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNKELKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDK  
 VSRFDFIRQIEVDGRLITLESGEFQVYKQSYALTALQTEQVQDSEDSRKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPESDRATYRGTAFSSDDAGGKLY  
 TIDFAVQKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEPTANGIHHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 49 - spo1197**

MNRTAFCCSLTAAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQTTTLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTK  
 KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 50 - spo1233**

MNRTAFCCSLTAAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTK  
 KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 51 - spo1279**

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQTTTLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTK  
 KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKGIEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 52 - spo1301**

MNRTAFCCSLTAAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQTTTLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGGHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTK  
 KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEEKTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 53 - spo1310**

MNRTAFCCSLTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFD  
 FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGGRATYRGTAFSGDDAGGKLYTIDFA  
 AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEPTANGIHHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 54 - spo1325**

MNRTAFCCLEFLTTLLITACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNKELKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGKMNVAKRFRKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGKAQEVAGSAEVKTANGIHHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 55 - spo2020**

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMNVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 56 - spo2068**

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEASIPQNGPLTSLAQGAEKTFKAGGRDMSLNTGKLN  
NDKVSFRDFVQKIEVDGQTIETLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRL  
HYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 57**

FQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMNVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAKQNGRIEHLKSPELNV  
DLAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKCSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 58**

FQVYKQSHSALTALQIEKINNPDKIDSMVAQRSLVSDIAGEHTSFDQLPDGKATYRGTAFGSDDAGGKLYHTIDFAKQGHGRIEHLKSPELNVD  
LAAADIKADEKSHAVISGSVRYGSEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIGEKVHEIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 59**

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTAFQTEQIINNPDKIDSMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDQLPDGKATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAA  
KQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKADEKSHAVISGSVLYGSEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIGEKVHEIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 60**

FQVYKQSHSALTAFQTEQIINNPDKIDSMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDQLPDGKATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAKQNGRIEHLKSPELNVE  
LAAADIKPDGKRHAVISGDTRYGSEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKIRNGIRRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 61**

KLPEGGR

**SEQ ID NO: 62**

QLPDCK

**SEQ ID NO: 63 - 4243 (I)**

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLMLDQSVRKNKELKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQEQDSEHSGKMNVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 64 - B3937 (II)**

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 65 - 24370 (II)**

MNRTAFCCLEFLTTALILTACSSGGGGVAADIGVGLADALTPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQTIETLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTK  
KQGYGRIEHLKTPQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 66**

GPDSRLLQRRG

**SEQ ID NO: 67**

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

**SEQ ID NO: 68**

CCCCTCGAGCTGTTTCCCGCGATGCC

**SEQ ID NO: 69**

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

**SEQ ID NO: 70**

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGCGGATGCC

**SEQ ID NO: 71**

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

**SEQ ID NO: 72**

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGCGGATGCC

**SEQ ID NO: 73**

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

**SEQ ID NO: 74**

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGCGGATGCC

**SEQ ID NO: 75**

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

**SEQ ID NO: 76**

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGCGGATGCC

**SEQ ID NO: 77**

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

**SEQ ID NO: 78**

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGCGGATGCC

**SEQ ID NO: 79**

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

**SEQ ID NO: 80**

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGCGGATGCC

**SEQ ID NO: 81**

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

**SEQ ID NO: 82**

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGCGGATGCC

**SEQ ID NO: 83**

CGCGGATCCCATATGGTCGCCGCCGACATCG

**SEQ ID NO: 84**

CCCGCTCGAGCTGTTTGC CGCGGATGCC

**SEQ ID NO: 85**

CGCGGATCCCATATGGGCCCTGATTCTGACCGCCTGCAGCAGCGGAGGGTCGCCGCCGACATCGG

**SEQ ID NO: 86 – gb013**

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYGNGLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKRADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 87 – ng688**

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYGNGLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAA  
KQGHGKIEHLKTPQNVELASAEKRADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 88 – m3697**

MNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYGNGLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQTIILASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTK  
KQYGRIEHLKTPQNVELASAEKRADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ



**SEQ ID NO: 89 – m2441**

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTPLDHDKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLN  
NDKISRFDVQKIEVDGQTTITLASEGFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKL  
TYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQETIAGSATVKIGEXVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 90 – gb200**

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHDKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGKLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKRRAVIGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 91 – m4256**

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHDKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPENVELATAYIKPDEKRRAVIGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIQHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 92 – m2197**

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHDKDKGLQSLMLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPENVDLAAAYIKPDEKHHAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 93 – nm008**

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHDKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAERTYGNQDLSLNTGKLNKDKVSRFD  
FIRQIEVDGQLITLESSEGFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFA  
AKQGHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDKRRHAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 94 – nm117**

MNRTAFCCFLTTALILTACSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHDKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLN  
NDKISRFDVQKIEVDGQTTITLASEGFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDAGGKL  
TYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEKGYHLALFGDRAQETIAGSATVKIGEXVHEIGIAGKQ

**SEQ ID NO: 95 – AG-nm117**

VAADIGAGLADALTAPLDHDKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTTITLASEGFQVYK  
QSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPENVDLAAA  
DIKPKDEKHHAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

**REIVINDICAÇÕES**

1. Polipeptídeo caracterizado por compreender uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos 85% de identidade ao Id. de Seq. N°:57, e em que um ou mais dos  
5 seguintes resíduos comparados a Id. De Seq N°:57, é substituído com um outro aminoácido ou é apagado: A67; G68; K70; K85; T147; V148; N149; I39; K48; E51; G52; R54; T56; A78; A79; D97; D102; P105; R109; S114; S116; L118; N120; Q121; A122; K135; T16; Q18; Q20; D21; S22; E23; H24; S25;  
10 G26; K27; K31; Q33; R35; I36; G37; G107; G150; I151; R152; H153.

2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos seguintes resíduos é substituído ou deletado: T16; Q18; Q20; D21;  
15 S22; E23; H24; S25; G26; K27; K31; Q33; R35; I36; G37; K48; E51; G52; R54; A79; K85; P105; G107; R109; L118; N120; Q121; A122; T147; V148; N149; G150; I151; R152; H153.

3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que E51 é apagado.

20 4. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos seguintes resíduos é substituído: T16; Q18; K31; Q33; R35; I36; G37; I39; T56; K70; A78; A79; K85; D97; D102; S114; S116; L118; K135.

25 5. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 ou 4, caracterizado por compreender uma substituição selecionada de: A67P; G68N; K70R; K85R; T147I; V148G; N149E; T16I; Q18K; Q20N; D21N; S22P; E23D; H24K; S25I; S25T; G26D; K27S; K31Q; Q33S; R35L; I36V; G37S; I39L;  
30 K48Q; G52D; R54K; T56E;; A78T; A79K; D97E; D102E; P105A;

G107E; R109S; S114L; S116D; L118R; N120G; Q121S; A122E;  
K135R; G150K; I151V; R152H; H153E.

6. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das  
reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de  
5 que a seqüência de aminoácidos tem pelo menos 90% de  
identidade ao Id. de Seq. N°:57.

7. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das  
reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato  
de compreender uma seqüência de aminoácidos selecionado de  
10 Id. de Seq. N°: 58, Id. de Seq. N°: 59 ou Id. de Seq. N°:  
60.

POLIPEPTÍDEOS QUIMÉRICOS, HÍBRIDOS E TANDEM DE NMB1870  
MENINGOCÓCICO

NMB 1870 é uma proteína em *Neisseria meningitidis*.  
Três famílias de NMB 1870 são conhecidas. Para aumentar a  
5 capacidade de uma proteína NMB 1870 de despertar anticorpos  
que são reativos de forma cruzada entre as famílias, NMB  
1870 é construído. Sequências podem ser substituídas de uma  
família de NMB 1870 na posição correspondente em uma outra  
família. Proteínas das seqüências de NMB 1870 de diferentes  
10 famílias podem ser ligadas umas às outras.