Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 05-116231

54. **TÍTULO** Composiciones Inmunogénicas Novedosas para la prevención y el tratamiento de enfermedad Meningococal.

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C12 N. A61K38/01

71. **SOLICITANTE** Wieth Holdings Corporation

DOMICILIO Madison, NJ. USA.

74. **APODERADO** Dilia María Rodríguez D' Aleman

22. **BOGOTÁ, D. C.,** NOV. 15/05

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 16-11-05

1) SOLICITUD DE:		
☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capitulo I.	☐ Capitulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	**Nombre: WYETH HOLDINGS CORPORATION** **Dirección: Five Giralda Faros, Madison, NJ 07940, Estados Unidos** **Nacionalidad o domicilio: Madison, NJ, Estados Unidos** **Lugar de constitución: NJ, Estados Unidos**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☐ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **Cual** _____ **NÚMERO** _____
	Teléfono: **Fax:** **E. Mail:**	
3) REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☒ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **NÚMERO:** 41.654.882 **TP:** 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) **(72)**	**Nombre: 1 ZLOTNICK, Gary, W.; 2. FLETCHER, Leah, D.; 3. FARLEY, John; 4. BERNFIELD, Liesel, A.; 5. ZAGURSKY, ROBERT, J; 6. METCALF, Benjamin, J.** **Dirección: 1. 21 Woodlyn Way, Penfield, NY 14526, Estados Unidos; 2. 37 Second Street, Geneseo, NY 14454, Estados Unidos; 3. 49 Evandale Road, Rochester, NY 14618, Estados Unidos; 4. 789, Thurston Road, Rochester, NY 14619, Estados Unidos; 5. 569 Fox Hunt Drive, Victor, NY 14564 Estados Unidos; 6. 15 Rensselaer Drive, Rochester, NY 14618 Estados Unidos** **Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, estadounidenses**	
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2004/011901 Fecha: Abril 16, 2004 Publicación Internacional No. WO2004/094596 A2 Fecha: Nov. 4, 2004		
6)Título (54) COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS NOVEDOSAS PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD MENINGOCOCAL		
7) Clasificación Internacional: C13N A61K38/01.		

8) PRIORIDAD	**33) País de Origen**	**(32) Fecha**	**(31) Número de Solicitud**
SI ☒ **NO** ☐	**Estados Unidos**	**Abril 16, 2003**	**60/463,161**

9) Comprobante de pago N°: 05-87,307 Fecha: Nov. 11, 2005

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

2

- SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO Folio: 428
Radicad.: 05116231 99999999
Fecha (AMD : 2005-11-15 17:06:33
Tramite . 311 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependenci.: 2020 DIVISION DE NUEVAS SOLICITUDES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 87,307
FECHA : NOVIEMBRE 11 DE 2005

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBCONSIGNACION		BANCO POPULAR	050-00110-6	42212714	11/11/2005	6,746,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL : $	443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

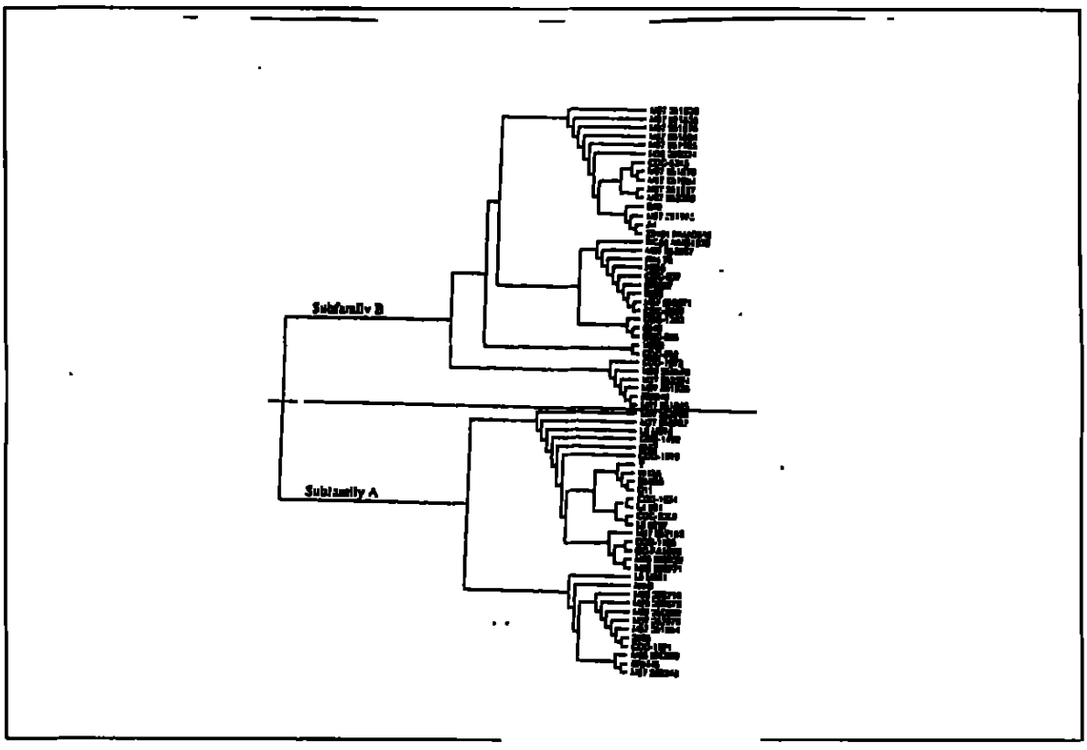
RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- [x] Poderes, si fuera el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] Otros:

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D´ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 November 2004 (04.11.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/094596 A2

(51) International Patent Classification[7]: C12N

(21) International Application Number:
PCT/US2004/011901

(22) International Filing Date: 16 April 2004 (16.04.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/463,161 16 April 2003 (16.04.2003) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): WYETH HOLDINGS CORPORATION [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

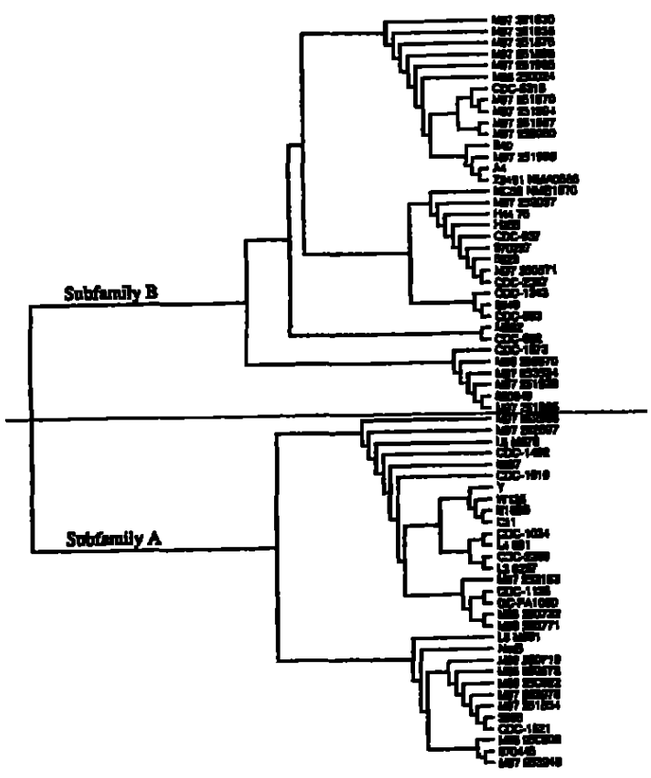
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): ZLOTNICK, Gary, W. [US/US]; 21 Woodlyn Way, Penfield, NY 14526 (US). FLETCHER, Leah, D. [US/US]; 37 Second Street, Geneseo, NY 14454 (US). FARLEY, John [US/US]; 49 Evandale Road, Rochester, NY 14618 (US). BERNFIELD, Liesel, A. [US/US]; 789 Thurston Road, Rochester, NY 14619 (US). ZAGURSKY, Robert, J. [US/US]; 569 Fox Hunt Drive, Victor, NY 14564 (US). METCALF, Benjamin, J. [US/US]; 15 Rensselaer Drive, Rochester, NY 14618 (US).

(74) Agents: SCHULMAN, Robert, M. et al.; Hunton & Williams, LLP, 1900 K Street, N.W., Suite 1200, Washington, DC 20006-1109 (US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL IMMUNOGENIC COMPOSITIONS FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF MENINGOCOCCAL DISEASE



(57) Abstract: The present invention relates to *Neisseria* ORF2086 proteins, crossreactive immunogenic proteins which can be isolated from neisserial strains or prepared recombinantly, including immunogenic portions thereof, biological equivalents thereof, antibodies that immunospecifically bind to the foregoing and nucleic acid sequences encoding each of the foregoing, as well as the use of same in immunogenic compositions that are effective against infection by *Neisseria meningitidis* serogroup B.

WO 2004/094596 A2

PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

NOVEL IMMUNOGENIC COMPOSITIONS FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF MENINGOCOCCAL DISEASE

Field of the Invention

The present invention relates to *Neisseria* ORF2086 proteins (Subfamily A and Subfamily B), which may be isolated from bacterial strains such as those of *Neisseria species*, including strains of *Neisseria meningitidis* (serogroups A, B, C, D, W-135, X, Y, Z and 29E), *Neisseria gonorrhoeae, and Neisseria lactamica*, as well as immunogenic portions and/or biological equivalents of said proteins. The present invention also relates to antibodies that immunospecifically bind to said proteins, immunogenic portions and/or biological equivalents. Further, the present invention relates to isolated polynucleotides comprising nucleic acid sequences encoding any of the foregoing proteins, immunogenic portions, biological equivalents and/or antibodies. Additionally, the present invention relates to immunogenic compositions and their use in preventing, treating and/or diagnosing meningococcal infection caused by *N. meningitidis*, and in particular meningococcal disease caused by *N. meningitidis* serogroup B, as well as methods for preparing said compositions. This invention relates to both recombinant forms and forms isolated from a natural source, as well as both lipidated and non-lipidated forms.

Background of the Invention

Meningococcal meningitis is a devastating disease that can kill children and young adults within hours despite the availability of antibiotics. Pizza *et al.*, 2000, *Science* 287:1816-1820. Meningitis is characterized as an inflammation of the meninges resulting in an intense headache, fever, loss of appetite, intolerance to light and sound, rigidity of muscles, especially in the neck, and in severe cases convulsions, vomiting and delirium leading to death. The symptoms of meningococcal meningitis appear suddenly and culminate in meningococcal septicemia with its characteristic hemorrhagic rash. A rapid diagnosis and immediate treatment with large doses of antibiotics is critical if there is to be any chance of survival. 2000. *Bantam Medical Dictionary, Third Edition* 302.

Meningococcal meningitis is caused by *Neisseria meningitidis* (the meningococcus), a Gram-negative, capsulated bacterium that has been classified into

several pathogenic serogroups including A, B, C, D, W-135, X, Y, Z and 29E. Serogroup B strains of *N. meningitidis* are a major cause of meningococcal disease throughout the world. For example, it is reported in the medical literature that serogroup B is responsible for about 50% of bacterial meningitis in infants and children residing in the United States and Europe. No vaccine currently exists to prevent meningococcal disease caused by *N. meningitidis* serogroup B.

Developing an immunogenic composition for the prevention of serogroup B meningococcal disease has been a challenge to researchers since the work of Goldschneider *et al.* over thirty years ago. Goldschneider *et al.*,1969, *J. Exp. Med* 129(6):1307-26; Goldschneider *et al*,1969; *J. Exp. Med* 129(6):1327-48; Gotschlich *et al.*,1969, *J. Exp. Med.* 129(6):1385-95; and Gotschlich *et al.*, 1969, *J. Exp. Med.* 129(6):1367-84. Unlike serogroup A disease, which virtually disappeared from North America after World War II, Achtman, M., 1995, *Trends in Microbiology* 3(5):186-92, disease caused by serogroup B and C organisms remains endemic throughout much of the economically developed world. The incidence of disease varies from <1/100,000 where endemic disease is rare to 200/100,000 in high risk populations during epidemics.

Vaccines based on polysaccharide conjugates have been developed against *N. meningitidis* serogroups A and C and appear to be effective in preventing disease. Currently, an immunogenic composition made of capsular polysaccharide from serogroups A, C, Y, & W-135 is available. Ambrosch *et al.*,1983, Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent. *Bulletin of the World Health Organization* 61(2):317-23. However, this immunogenic composition elicits a T-cell independent immune response, is not effective in young children, and provides no coverage for serogroup B strains, which cause upwards of 50% of meningococcal disease.

Others have also attempted to develop immunogenic compositions using capsular polysaccharides. Recently, immunogenic compositions for serogroup C disease prepared by conjugating the serogroup C capsular material to proteins have been licensed for use in Europe. However, the serogroup B capsule may be unsuitable as a vaccine candidate because the capsule polysaccharide is composed of polysialic acid which bears a similarity to carbohydrate moieties on developing

human neural tissues. This sugar moiety is recognized as a self-antigen and is thus poorly immunogenic in humans.

Outer membrane proteins (OMP's) have been developed as alternative vaccine antigens for serogroup B disease. Monoclonal antibody binding to the two variable regions of PorA define the serosubtyping scheme for meningococci. PorA proteins thus serve as the serosubtyping antigens (Abdillahi *et al.*, 1988, *Microbial Pathogenesis* 4(1):27-32) for meningococcal strains and are being actively investigated as components of a serogroup B immunogenic composition (Poolman, 1996, *Adv. Exp. Med. Biol.* 397:73-7), since they can elicit bactericidal antibodies (Saukkonen, 1987, *Microbial Pathogenesis* 3(4):261-7). Bactericidal antibodies are thought to be an indicator of protection and any new immunogenic composition candidate should elicit these functional antibodies.

Studies in humans as well as animals indicate that the serosubtyping antigen, PorA, elicits bactericidal antibodies. However, the immune response to Por A is generally serosubtype specific. In particular, serosubtyping data indicate that an immunogenic composition made of PorAs may require a PorA for each serosubtype to be covered by such an immunogenic composition, perhaps as many as six to nine. Therefore, 6-9 PorAs will be needed to cover 70-80% of serogroup B strains. Thus, the variable nature of this protein requires a multivalent vaccine composition to protect against a sufficient number of meningococcal serosubtype clinical isolates.

Developing an immunogenic composition for serogroup B meningococci has been so difficult that recently several groups have sequenced the genomes from strains representing both serogroups A and B to assist in identifying new immunogenic composition candidates. Tettelin, 2000, *Science*, 287(5459):1809-15; Pizza *et al.*, 2000, *Science* 287:1816-1820. Identifying new immunogenic composition candidates, even with the knowledge of the neisserial genome, is a challenging process for which adequate mathematical algorithms do not currently exist. In fact, a recent report indicates that despite identifying hundreds of open reading frames ("ORFs") containing theoretical membrane spanning domains, problems with expression, purification, and inducing surface reactive, and functionally active antibodies have led investigators to only seven candidates for a

serogroup B meningococcal immunogenic composition. *See Id.* One of these was previously known.

Accordingly, there remains a need for immunogenic compositions that (1) elicit bactericidal antibodies to multiple neisserial strains; (2) react with the surface of multiple strains; (3) confer passive protection against a live challenge; and/or (4) prevent colonization.

Summary of the Invention

To meet these and other needs, and in view of its purposes, the present invention provides *Neisseria* ORF2086 proteins ("2086 proteins"), including 2086 Subfamily A proteins and 2086 Subfamily B proteins. Each of the 2086 proteins are proteins that can be isolated from native neisserial strains, including strains of *Neisseria meningitidis* (serogroups A, B, C, D, W-135, X, Y, Z and 29E), *Neisseria gonorrhoeae, and Neisseria lactamica.* The 2086 proteins may also be prepared using recombinant technology.

In particular, the present invention provides the 2086 proteins, immunogenic portions thereof, and/or biological equivalents thereof, antibodies that immunospecifically bind to any of the foregoing, and polynucleotides comprising nucleic acid sequences that encode any of the foregoing. The present invention includes compositions, immunogenic compositions and their use in preventing, treating and/or diagnosing meningococcal infection, and in particular meningococcal disease caused by *N. meningitidis*, as well as methods for preparing said compositions. The 2086 proteins herein include recombinant forms and forms isolated from a natural source, as well as both lipidated and non-lipidated forms.

The present invention unexpectedly and advantageously provides compositions that (1) elicit bactericidal antibodies to multiple neisserial strains, such as strains of *N. meningitidis, N. gonorrhoeae*, and/or *N. lactamica*; (2) react with the surface of multiple strains; (3) confer passive protection against a live challenge; and/or (4) prevent colonization, as well as methods of using said compositions and methods of preparing said compositions. Various embodiments of the invention are described below.

Brief Description of the Drawings

FIG. 1A depicts an SDS-PAGE gel that depicts the two major proteins of the protein fractions obtained from the experiments for identifying neisserial membrane protein extract that is capable of eliciting bactericidal antibodies against heterologous strains.

FIG. 1B depicts the results from the experiments from the identification of the two major proteins by analysis of TMAE Flow Through components by protease digestion and reverse Phase N-terminal sequencing.

FIG. 2 depicts the purification scheme and homogeneity as determined by SDS-PAGE of rLP2086.

FIG. 3 depicts the results from the experiments from the identification of the two major proteins and one minor protein by analysis of TMAE Flow Through components by LC-MS/MS and the corresponding SDS-PAGE.

FIG. 4 is an SDS-PAGE gel from the recombinant expression of 2086 protein.

FIG. 5 is a schematic diagram of plasmid pPX7340, as described in the examples herein.

FIG. 6 is a schematic diagram of plasmid pPX7328 as described in the examples herein.

FIG. 7 is a schematic diagram of plasmid pPX7343 as described in the examples herein.

FIG. 8 illustrates N-terminal regions of 2086 gene from various strains.

FIG. 9A is a flow chart showing the preliminary steps in the identification of an immunogenic component in a neisserial strain.

FIG. 9B is a flow chart showing the final steps in the identification of an immunogenic component in a neisserial strain.

FIG. 10A is a schematic diagram of the pBAD arabinose inducible promoter which drives the expression of the P4 signal/ORF2086 fusion protein to express a lipidated form of rP2086 as described in the examples herein.

FIG. 10B is a schematic diagram of the pET9a-T7 vector for recombinant expression of nonlipidated form of ORF2086.

FIG. 11A is a photograph representing whole cell lysates of *E. coli* B expressing the rLP2086 protein.

FIG. 11B shows whole cell lysates of *E. coli* B expressing the rP2086 protein.

FIG. 12 is a phylogenetic tree showing an organization of the subfamilies and groups of ORF2086 proteins according an implementation of the present invention.

FIG. 13 is a graphic illustration of whole cell ELISA data for the rLP2086 Subfamily A antisera.

FIG. 14 is a graphical illustration of whole cell ELISA data for the rLP2086 Subfamily B antisera.

FIG. 15 is a graphical illustration of the results of the rLP2086 mixing study - WCE Titers.

FIG. 16 is a graphical illustration of the results of the rLP2086/rPorA mixing study - WCE Titers.

FIG. 17 is a Western Blot showing reactivity of rLP2086 mouse antisera to P2086 Subfamily B *N. meningitidis* whole cell lysates.

FIG. 18 is a Western Blot showing reactivity of rLP2086 mouse antisera to P2086 Subfamily A *N. meningitidis* and *N. lactamica* whole cell lysates.

FIG. 19 is a phylogenetic tree showing an organization of subfamilies and groups of ORF2086 proteins according to an implementation of the invention.

FIG. 20 is a sequence alignment comparing polypeptides of the present invention.

Sequence Summary

SEQ ID NOS. For Studied Sequences:

SEQ ID NO:1 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L3 6275 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:2 amino acid sequence for mature 2086 protein from L3 6275 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:3 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L3 6275 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:4 amino acid sequence for mature 2086 protein from L3 6275 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:5 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L3 6275 strain.

SEQ ID NO:6 amino acid sequence for mature 2086 protein from L3 6275 strain.

SEQ ID NO:7 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC2369 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:8 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC2369 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:9 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC2369 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:10 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC2369 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:11 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC2369 strain.

SEQ ID NO:12 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC2369 strain.

SEQ ID NO:13 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1034 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:14 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1034 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:15 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1034 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:16 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1034 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:17 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1034 strain.

SEQ ID NO:18 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1034 strain.

SEQ ID NO:19 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L4 891 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:20 amino acid sequence for mature 2086 protein from L4 891 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:21 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L4 891 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:22 amino acid sequence for mature 2086 protein from L4 891 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:23 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L4 891 strain.

SEQ ID NO:24 amino acid sequence for mature 2086 protein from L4 891 strain.

SEQ ID NO:25 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from B16B6 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:26 amino acid sequence for mature 2086 protein from B16B6 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:27 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from B16B6 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:28 amino acid sequence for mature 2086 protein from B16B6 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:29 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from B16B6 strain.

SEQ ID NO:30 amino acid sequence for mature 2086 protein from B16B6 strain.

SEQ ID NO:31 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from W135 (ATCC35559) strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:32 amino acid sequence for mature 2086 protein from W135 (ATCC35559) strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:33 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from W135 (ATCC35559) when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:34 amino acid sequence for mature 2086 protein from W135 (ATCC35559) strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:35 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from W135 (ATCC35559) strain.

SEQ ID NO:36 amino acid sequence for mature 2086 protein from W135 (ATCC35559) strain.

SEQ ID NO:37 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from C11 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:38 amino acid sequence for mature 2086 protein from C11 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:39 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from C11 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:40 amino acid sequence for mature 2086 protein from C11 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:41 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from C11 strain.

SEQ ID NO:42 amino acid sequence for mature 2086 protein from C11 strain.

SEQ ID NO:43 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from Y (ATCC35561) strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:44 amino acid sequence for mature 2086 protein from Y (ATCC35561) strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:45 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from Y (ATCC35561) when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:46 amino acid sequence for mature 2086 protein from Y (ATCC35561) strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:47 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from Y (ATCC35561) strain.

SEQ ID NO:48 amino acid sequence for mature 2086 protein from Y (ATCC35561) strain.

SEQ ID NO:49 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250732 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:50 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250732 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:51 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250732 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:52 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250732 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:53 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250732 strain.

SEQ ID NO:54 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250732 strain.

SEQ ID NO:55 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250771 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:56 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250771 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:57 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250771 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:58 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250771 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:59 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250771 strain.

SEQ ID NO:60 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250771 strain.

SEQ ID NO:61 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1135 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:62 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1135 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:63 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1135 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:64 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1135 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:65 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1135 strain.

SEQ ID NO:66 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1135 strain.

SEQ ID NO:67 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252153 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:68 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252153 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:69 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252153 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:70 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252153 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:71 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252153 strain.

SEQ ID NO:72 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252153 strain.

SEQ ID NO:73 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1610 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:74 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1610 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:75 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1610 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:76 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1610 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:77 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1610 strain.

SEQ ID NO:78 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1610 strain.

SEQ ID NO:79 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1492 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:80 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1492 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:81 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1492 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:82 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1492 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:83 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1492 strain.

SEQ ID NO:84 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1492 strain.

SEQ ID NO:85 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L8 M978 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:86 amino acid sequence for mature 2086 protein from L8 M978 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:87 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L8 M978 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:88 amino acid sequence for mature 2086 protein from L8 M978 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:89 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L8 M978 strain.

SEQ ID NO:90 amino acid sequence for mature 2086 protein from L8 M978 strain.

SEQ ID NO:91 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252988 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:92 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252988 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:93 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252988 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:94 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252988 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:95 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252988 strain.

SEQ ID NO:96 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252988 strain.

SEQ ID NO:97 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252697 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:98 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252697 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:99 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252697 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:100 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252697 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:101 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252697 strain.

SEQ ID NO:102 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252697 strain.

SEQ ID NO:103 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 6557 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:104 amino acid sequence for mature 2086 protein from 6557 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:105 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 6557 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:106 amino acid sequence for mature 2086 protein from 6557 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:107 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 6557 strain.

SEQ ID NO:108 amino acid sequence for mature 2086 protein from 6557 strain.

SEQ ID NO:109 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 2996 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:110 amino acid sequence for mature 2086 protein from 2996 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:111 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 2996 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:112 amino acid sequence for mature 2086 protein from 2996 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:113 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 2996 strain.

SEQ ID NO:114 amino acid sequence for mature 2086 protein from 2996 strain.

SEQ ID NO:115 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252976 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:116 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252976 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:117 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252976 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:118 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252976 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:119 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252976 strain.

SEQ ID NO:120 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252976 strain.

SEQ ID NO:121 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 251854 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:122 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 251854 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:123 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 251854 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:124 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 251854 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:125 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 251854 strain.

SEQ ID NO:126 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 251854 strain.

SEQ ID NO:127 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1521 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:128 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1521 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:129 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1521 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:130 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1521 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:131 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1521 strain.

SEQ ID NO:132 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1521 strain.

SEQ ID NO:133 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250622 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:134 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250622 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:135 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250622 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:136 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250622 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:137 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250622 strain.

SEQ ID NO:138 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250622 strain.

SEQ ID NO:139 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 870446 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:140 amino acid sequence for mature 2086 protein from 870446 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:141 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 870446 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:142 amino acid sequence for mature 2086 protein from 870446 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:143 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 870446 strain.

SEQ ID NO:144 amino acid sequence for mature 2086 protein from 870446 strain.

SEQ ID NO:145 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253248 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:146 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253248 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:147 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253248 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:148 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253248 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:149 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253248 strain.

SEQ ID NO:150 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253248 strain.

SEQ ID NO:151 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250809 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:152 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250809 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:153 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250809 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:154 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250809 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:155 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250809 strain.

SEQ ID NO:156 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250809 strain.

SEQ ID NO:157 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L5 M981 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:158 amino acid sequence for mature 2086 protein from L5 M981 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:159 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L5 M981 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:160 amino acid sequence for mature 2086 protein from L5 M981 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:161 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from L5 M981 strain.

SEQ ID NO:162 amino acid sequence for mature 2086 protein from L5 M981 strain.

SEQ ID NO:163 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from NMB strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:164 amino acid sequence for mature 2086 protein from NMB strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:165 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from NMB when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:166 amino acid sequence for mature 2086 protein from NMB strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:167 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from NMB strain.

SEQ ID NO:168 amino acid sequence for mature 2086 protein from NMB strain.

SEQ ID NO:169 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250572 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:170 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250572 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:171 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250572 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:172 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250572 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:173 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250572 strain.

SEQ ID NO:174 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250572 strain.

SEQ ID NO:175 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; or M97 251830 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:176 amino acid sequence for mature 2086 protein from A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97

251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; or M97 251830 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:177 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; or M97 251830 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:178 amino acid sequence for mature 2086 protein from A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; or M97 251830 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:179 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from A4 Sanford; M97 251836 part; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; or M97 251830 strain.

SEQ ID NO:180 amino acid sequence for mature 2086 protein from A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; or M97 251830 strain.

SEQ ID NO:181 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC937 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:182 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC937 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:183 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC937 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:184 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC937 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:185 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC937 strain.

SEQ ID NO:186 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC937 strain.

SEQ ID NO:187 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252097 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:188 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252097 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:189 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252097 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:190 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252097 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:191 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252097 strain.

SEQ ID NO:192 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 252097 strain.

SEQ ID NO:193 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 870227 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:194 amino acid sequence for mature 2086 protein from 870227 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:195 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 870227 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:196 amino acid sequence for mature 2086 protein from 870227 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:197 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 870227 strain.

SEQ ID NO:198 amino acid sequence for mature 2086 protein from 870227 strain.

SEQ ID NO:199 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from H355 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:200 amino acid sequence for mature 2086 protein from H355 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:201 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from H355 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:202 amino acid sequence for mature 2086 protein from H355 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:203 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from H355 strain.

SEQ ID NO:204 amino acid sequence for mature 2086 protein from H355 strain.

SEQ ID NO:205 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from H44_76 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:206 amino acid sequence for mature 2086 protein from H44_76 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:207 amino acid sequence for mature 2086 protein from H44_76 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:208 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from H44_76 strain.

SEQ ID NO:209 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from H44_76 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:210 amino acid sequence for mature 2086 protein from H44_76 strain.

SEQ ID NO:211 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 8529 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:212 amino acid sequence for mature 2086 protein from 8529 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:213 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 8529 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:214 amino acid sequence for mature 2086 protein from 8529 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:215 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 8529 strain.

SEQ ID NO:216 amino acid sequence for mature 2086 protein from 8529 strain.

SEQ ID NO:217 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 6940 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:218 amino acid sequence for mature 2086 protein from 6940 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:219 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 6940 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:220 amino acid sequence for mature 2086 protein from 6940 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:221 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 6940 strain.

SEQ ID NO:222 amino acid sequence for mature 2086 protein from 6940 strain.

SEQ ID NO:223 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M982 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:224 amino acid sequence for mature 2086 protein from M982 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:225 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M982 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:226 amino acid sequence for mature 2086 protein from M982 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:227 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M982 strain.

SEQ ID NO:228 amino acid sequence for mature 2086 protein from M982 strain.

SEQ ID NO:229 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 880049 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:230 amino acid sequence for mature 2086 protein from 880049 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:231 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 880049 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:232 amino acid sequence for mature 2086 protein from 880049 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:233 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from 880049 strain.

SEQ ID NO:234 amino acid sequence for mature 2086 protein from 880049 strain.

SEQ ID NO:235 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253524, M97 251885, and M97 251926 strains when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:236 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253524, M97 251885, and M97 251926 strains prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:237 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253524, M97 251885, and M97 251926 strains when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:238 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253524, M97 251885, and M97 251926 strains prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:239 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253524, M97 251885, and M97 251926 strains.

SEQ ID NO:240 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 253524, M97 251885, and M97 251926 strains.

SEQ ID NO:241 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250670 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:242 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250670 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:243 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250670 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:244 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250670 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:245 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250670 strain.

SEQ ID NO:246 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250670 strain.

SEQ ID NO:247 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1573 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:248 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1573 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:249 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1573 when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:250 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1573 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:251 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1573 strain.

28

SEQ ID NO:252 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC1573 strain.

SEQ ID NO:253 partial nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from a strain of *Neisseria lactamica*.

SEQ ID NOS:254 to 259 amino acid sequences associated with proteins of 2086 family of proteins.

SEQ ID NOS:260 to 278 amino acid sequences associated with proteins of 2086 Subfamily A.

SEQ ID NOS:279 to 299 amino acid sequences associated with proteins of 2086 Subfamily B.

SEQ ID NO:300 is the amino acid consensus sequence corresponding to the 2086 protein family ("2086 proteins") according to an embodiment of the present invention.

SEQ ID NO:301 is the amino acid consensus sequence corresponding to the 2086 protein Subfamily A according to an embodiment of the present invention.

SEQ ID NO:302 is the amino acid consensus sequence corresponding to the 2086 protein Subfamily B according to an embodiment of the present invention.

SEQ ID NO:303 nucleic acid sequence for a reverse primer with BamHI restriction site (Compound No. 4623).

SEQ ID NO:304 nucleic acid sequence for a forward primer with NdeI restriction site (Compound No. 4624).

SEQ ID NO:305 nucleic acid sequence for a forward primer (Compound No. 4625).

SEQ ID NO:306 nucleic acid sequence for a forward primer (Compound No. 5005).

SEQ ID NO:307 nucleic acid sequence for a reverse primer (Compound No. 5007).

SEQ ID NO:308 nucleic acid sequence for a reverse primer with BglII restriction site (Compound No. 5135).

SEQ ID NO:309 nucleic acid sequence for a forward primer with BamHI restriction site (Compound No. 5658).

SEQ ID NO:310 nucleic acid sequence for a reverse primer with SphI restriction site (Compound No. 5660).

SEQ ID NO:311 nucleic acid sequence for a forward primer with BamHI restriction site (Compound No. 6385).

SEQ ID NO:312 nucleic acid sequence for a forward primer with BglII and NdeI restriction sites (Compound No. 6406).

SEQ ID NO:313 nucleic acid sequence for a forward primer (Compound No. 6470).

SEQ ID NO:314 nucleic acid sequence for a reverse primer (Compound No. 6472).

SEQ ID NO:315 nucleic acid sequence for a forward primer with BamHI restriction site (Compound 6473).

SEQ ID NO:316 nucleic acid sequence for a forward primer with BglII and NdeI restriction sites (Compound No. 6474).

SEQ ID NO:317 nucleic acid sequence for a forward primer (Compound No. 6495).

SEQ ID NO:318 nucleic acid sequence for a reverse primer (Compound No. 6496).

SEQ ID NO:319 nucleic acid sequence for a reverse primer with SphI restriction site (Compound No. 6543).

SEQ ID NO:320 nucleic acid sequence for a reverse primer with BglII restriction site (Compound No. 6605).

SEQ ID NO:321 nucleic acid sequence for a forward primer with BglII and NdeI restriction sites (Compound No. 6721).

SEQ ID NO:322 nucleic acid sequence for the P4 leader sequence.

SEQ ID NO:323 nucleic acid sequence for native 2086 leader variant 1.

SEQ ID NO:324 nucleic acid sequence for native 2086 leader variant 2.

SEQ ID NO:325 nucleic acid sequence for native 2086 leader variant 3.

SEQ ID NO:326 nucleic acid sequence for native 2086 leader variant 4.

SEQ ID NO:327 is the amino acid sequence of P4431.

SEQ ID NO:328 is the amino acid sequence of P5163.

SEQ ID NO:329 is an amino acid sequence according to an embodiment of the present invention.

SEQ ID NO:330 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from 880049 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:331 amino acid sequence for 2086 protein from 880049 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:332 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from 880049 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:333 amino acid sequence for 2086 protein from 880049 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:334 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from 880049 strain.

SEQ ID NO:335 amino acid sequence for 2086 protein from 880049 strain.

SEQ ID NO:336 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-937 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:337 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-937 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:338 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-937 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:339 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-937 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:340 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-937 strain.

SEQ ID NO:341 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-937 strain.

SEQ ID NO:342 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from M97 252097 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:343 amino acid sequence for 2086 protein from M97 252097 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:344 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from M97 252097 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:345 amino acid sequence for 2086 protein from M97 252097 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:346 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from M97 252097 strain.

SEQ ID NO:347 amino acid sequence for 2086 protein from M97 252097 strain.

SEQ ID NO:348 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from B40 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:349 amino acid sequence for 2086 protein from B40 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:350 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from B40 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:351 amino acid sequence for 2086 protein from B40 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:352 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from B40 strain.

SEQ ID NO:353 amino acid sequence for 2086 protein from B40 strain.

SEQ ID NO:354 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from B40 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:355 amino acid sequence for mature 2086 protein from B40 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:356 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from B40 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:357 amino acid sequence for mature 2086 protein from B40 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:358 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from B40 strain.

SEQ ID NO:359 amino acid sequence for mature 2086 protein from B40 strain.

SEQ ID NO:360 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-1343 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:361 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-1343 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:362 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-1343 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:363 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-1343 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:364 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-1343 strain.

SEQ ID NO:365 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-1343 strain.

SEQ ID NO:366 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-1343 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:367 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-1343 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:368 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-1343 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:369 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-1343 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:370 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-1343 strain.

SEQ ID NO:371 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-1343 strain.

SEQ ID NO:372 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-2367 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:373 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-2367 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:374 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-2367 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:375 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-2367 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:376 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-2367 strain.

SEQ ID NO:377 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-2367 strain.

SEQ ID NO:378 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-2367 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:379 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-2367 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:380 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-2367 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:381 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-2367 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:382 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-2367 strain.

SEQ ID NO:383 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-2367 strain.

SEQ ID NO:384 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-5315 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:385 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-5315 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:386 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-5315 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:387 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-5315 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:388 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-5315 strain.

SEQ ID NO:389 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-5315 strain.

SEQ ID NO:390 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-5315 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:391 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-5315 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:392 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-5315 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:393 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-5315 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:394 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-5315 strain.

SEQ ID NO:395 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-5315 strain.

SEQ ID NO:396 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-852 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:397 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-852 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:398 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-852 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:399 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-852 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:400 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-852 strain.

SEQ ID NO:401 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-852 strain.

SEQ ID NO:402 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-852 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:403 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-852 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:404 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-852 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:405 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-852 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:406 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-852 strain.

SEQ ID NO:407 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-852 strain.

SEQ ID NO:408 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-983 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:409 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-983 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:410 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-983 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:411 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-983 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:412 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from CDC-983 strain.

SEQ ID NO:413 amino acid sequence for 2086 protein from CDC-983 strain.

SEQ ID NO:414 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-983 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:415 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-983 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:416 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-983 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:417 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-983 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:418 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-983 strain.

SEQ ID NO:419 amino acid sequence for mature 2086 protein from CDC-983 strain.

SEQ ID NO:420 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from M97 250571 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:421 amino acid sequence for 2086 protein from M97 250571 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:422 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from M97 250571 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:423 amino acid sequence for 2086 protein from M97 250571 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:424 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from M97 250571 strain.

SEQ ID NO:425 amino acid sequence for 2086 protein from M97 250571 strain.

SEQ ID NO:426 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 250571 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:427 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 250571 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:428 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 250571 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:429 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 250571 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:430 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 250571 strain.

SEQ ID NO:431 amino acid sequence for mature 2086 protein from M97 250571 strain.

SEQ ID NO:432 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from M98 250716 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:433 amino acid sequence for 2086 protein from M98 250716 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:434 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for 2086 protein from M98 250716 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:435 amino acid sequence for 2086 protein from M98 250716 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:436 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for 2086 protein from M98 250716 strain.

SEQ ID NO:437 amino acid sequence for 2086 protein from M98 250716 strain.

SEQ ID NO:438 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250716 strain when combined with a native leader sequence.

SEQ ID NO:439 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250716 strain prepared using a native leader sequence.

SEQ ID NO:440 nucleic acid sequence for encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250716 strain when combined with a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:441 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250716 strain prepared using a P4 leader sequence.

SEQ ID NO:442 nucleic acid sequence encoding amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250716 strain.

SEQ ID NO:443 amino acid sequence for mature 2086 protein from M98 250716 strain.

SEQ ID NOS:444 to 449 amino acid sequences associated with proteins of 2086 Subfamily B.

SEQ ID NOS:450 to 452 amino acid sequences associated with proteins of 2086 Subfamily A.

Detailed Description of the Invention

A new class of antigens with cross-functional bactericidal activity against *Neisseria meningitidis* serogroup B would obviate the need for a multi-valent PorA approach to immunization against infection. Such an antigen has been unexpectedly identified and is described and claimed herein. The presence of one such antigen was first observed in a complex mixture of soluble outer membrane proteins (sOMPs) from a meningococcal strain. The bactericidal activity of this antigen was followed through a series of fractionation and protein purification steps until the protein mixture of interest contained just a few proteins. The major proteins in this mixture were identified by N-terminal amino acid sequencing and peptide mapping. The protein of interest exhibiting bactericidal activity was identified as ORF2086 protein, a lipidated protein (also more specifically referred to as LP2086). "ORF2086 protein" refers to a protein encoded by open reading frame 2086 (ORF2086) of *Neisseria species*.

As described herein, new immunogenic composition candidates based on *Neisseria species* ORF2086 protein (also referred to as "2086 protein" or "ORF2086" protein, used interchangably herein, or P2086 for the non-lipated proteins and LP2086 for the lipidated version of the proteins) isolated from *N. meningitidis* were identified by combining cell fractionation, differential detergent extraction, protein purification, with the preparation of antisera, and a bactericidal activity assay utilizing multiple strains. As an alternative to potential immunogenic compositions and diagnostics disclosed in the references cited above, this invention relates to compositions and methods of treating and/or preventing meningococcal

infection through the use of proteins, immunogenic portions thereof and biological equivalents thereof, as well as genes encoding said polypeptides, portions and equivalents, and antibodies that immunospecifically bind to same.

According to an embodiment of the present invention, immunogenic agents based on 2086 protein, including isolated polypeptides, immunogenic portions thereof and/or biological equivalents thereof were unexpectedly identified as immunogenic candidates based on the ability of said agents to exhibit cross-reactivity or non-strain specificity. In particular, candidates were identified that unexpectedly demonstrate the ability to (1) elicit bactericidal antibodies to multiple neisserial and/or gonococcal strains; (2) react with the surface of multiple strains; (3) confer passive protection against a live challenge; and/or (4) prevent colonization. Accordingly, the present invention provides immunogenic compositions comprising said immunogenic agents, including isolated polypeptides, immunogenic portions thereof, and/or biological equivalents thereof, as well as methods for using same against infection by *N. meningitidis*. (See Example 1 herein for the methodology used in the identification of the 2086 protein.)

As used herein, the term "non-strain specific" refers to the characteristic of an antigen to elicit an immune response effective against more than one strain of *N. meningitidis* (e.g., heterologous meningococcal strains). The term "cross-reactive" as it is used herein is used interchangeably with the term "non-strain specific". The term "immunogenic non-strain specific *N. meningitidis* antigen," as used herein, describes an antigen that can be isolated from *N. meningitidis*, although it can also be isolated from another bacterium (e.g., other neisserial strains, such as gonococcal strains, for example), or prepared using recombinant technology.

The 2086 proteins of the present invention include lipidated and non-lipidated proteins. Further, the present invention also contemplates the use of the immature proteins or preproteins that correspond to each protein as intermediate compounds/compositions.

The present invention also provides antibodies that immunospecifically bind to the foregoing immunogenic agents, according to implementations of the invention. Further, the present invention relates to isolated polynucleotides

comprising nucleic acid sequences encoding any of the foregoing. Additionally, the present invention provides compositions and/or immunogenic compositions and their use in preventing, treating and/or diagnosing meningococcal meningitis, in particular serogroup B meningococcal disease, as well as methods for preparing said compositions.

The compositions of the present invention have been shown to be highly immunogenic and capable of eliciting the production of bactericidal antibodies. These antibodies are cross-reactive to serogroup, serotype and serosubtype heterologous meningococcal strains. Accordingly, the present compositions overcome the deficiencies of previous *N. meningitidis* vaccine attempts by exhibiting the ability to elicit bactericidal antibodies to heterologous neisserial strains. Thus, among other advantages, the present invention provides immunogenic compositions that can be compounded with fewer components to elicit protection comparable to previously used agents. The compositions or immunogenic agents therein (e.g., polypeptides, immunogenic portions or fragments, and biological equivalents, etc., without limitation) can be used alone or in combination with other antigens or agents to elicit immunological protection from meningococcal infection and disease, as well as to elicit immunological protection from infection and/or disease caused by other pathogens. This simplifies the design of an immunogenic composition for use against meningococcal infection by reducing the number of antigens required for protection against multiple strains. In fact, purified 2086 protein will dramatically and unexpectedly reduce the number of proteins required to provide adequate immunogenic coverage of the strains responsible for meningococcal disease. The 2086 protein can be recombinantly expressed in *E. coli* as a lipoprotein, which is the wild type form of the protein, at levels much higher than in the native meningococci.

Because antibodies directed against the 2086 protein from a single strain were found to kill unrelated (i.e., heterologous) strains, an attempt was made to characterize a large number of heterologous strains for the presence of a "2086 homolog", and to determine the level of sequence conservation. While about 70% of the strains tested by PCR had 2086 homologs that could be amplified using the

primers that amplified the original 2086 gene from strain 8529, the remaining approximately 30% were negative by this test. These remaining approximately 30% were found to contain a 2086 homolog that has only about 60% amino acid sequence homology to the original 8529 derived 2086 gene. Other primers were identified that could amplify a 2086 homolog from these approximately 30% of strains. The *N. meningitidis* strains tested have been designated as belonging to Subfamily A or Subfamily B depending on which primer set can amplify a 2086 homolog. The details of these experiments are outlined in Example 5 below.

The presence of a 2086 protein in numerous serosubtypes.

To determine the level of sequence conservation of the 2086 gene between *N. meningitidis* strains, several representatives from Subfamilies A and B were cloned as full length genes and submitted for DNA sequence analysis. Using primers as disclosed herein, see, for example, Table IV, twenty four serogroup B meningococcal strains were identified, which express different serosubtype antigens and also express a shared protein, P2086. Examples of these sequences are provided herein and are shown as mature DNA sequences (i.e., all lipoprotein signal sequences have been cleaved at the cysteine residue). See, for example, the amino acid sequences of even numbered SEQ ID NOS: 2-252 and the odd numbered SEQ ID NOS:331-443, without limitation.

Although the 2086 protein is not present in large amounts in wild type strains, it is a target for bactericidal antibodies. These antibodies, unlike those produced in response to the PorAs, are capable of killing strains expressing heterologous serosubtypes.

Antibodies to the 2086 protein also passively protect infant rats from challenge with meningococci. (see Table VII) Recombinant expression of 2086 protein enables the use of 2086 protein as an immunogenic composition for the prevention of meningococcal disease. All of the recent meningococcal immunogenic composition candidates in clinical trials have been complex mixtures or outer membrane protein preparations containing many different proteins. The PorA protein, that provides serosubtype specificity, will require the inclusion of 6 to 9 variants in an immunogenic composition to provide about 70-80% coverage of

disease related serosubtypes. In contrast, it is clearly demonstrated herein that antisera to a single 2086 protein alone is able to kill representatives of six serosubtypes responsible for about 65% of the disease isolates in western Europe and the United States. Therefore, purified 2086 protein has the potential to reduce the number of proteins required to provide adequate immunogenic composition coverage of the serosubtypes responsible for meningococcal disease.

Proteins, Immunogenic Portions and Biological Equivalents

The 2086 proteins provided by the present invention are isolated proteins. The term "isolated" means altered by the hand of man from the natural state. If an "isolated" composition or substance occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polypeptide or a polynucleotide naturally present in a living animal is not "isolated," but the same polypeptide or polynucleotide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein. Accordingly, as used herein, the term "isolated protein" encompasses proteins isolated from a natural source and proteins prepared using recombinant technology, as well as such proteins when combined with other antigens and/or additives, such as pharmaceutically acceptable carriers, buffers, adjuvants, etc., for example.

A 2086 protein, immunogenic portion thereof and/or a biological equivalent thereof, according an embodiment of the invention, comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

ADIGxGLADA (SEQ ID NO:254), wherein x is any amino acid;

IGxGLADALT (SEQ ID NO:255), wherein x is any amino acid;

SLNTGKLKND (SEQ ID NO:256);

SLNTGKLKNDKxSRFDF (SEQ ID NO:257, wherein x is any amino acid);

SGEFQxYKQ (SEQ ID NO:258), wherein x is any amino acid;

IEHLKxPE (SEQ ID NO:259), wherein x is any amino acid; or combinations thereof.

A 2086 Subfamily A protein, immunogenic portion thereof and/or biological equivalent thereof comprises an amino acid sequence selected from the group

consisting of the following amino acid sequences, in accordance with an embodiment of the present invention:

GGGVAADIGx (SEQ ID NO:260), wherein x is any amino acid;
SGEFQIYKQ (SEQ ID NO:261);
HSAVVALQIE (SEQ ID NO:262);
EKINNPDKID (SEQ ID NO:263);
SLINQRSFLV (SEQ ID NO:264);
SGLGGEHTAF (SEQ ID NO:265);
GEHTAFNQLP (SEQ ID NO:266);
SFLVSGLGGEH (SEQ ID NO:267);
EKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP (SEQ ID NO:268);
GKAEYHGKAF (SEQ ID NO:269);
YHGKAFSSDD (SEQ ID NO:270);
GKAEYHGKAFSSDD (SEQ ID NO:271);
IEHLKTPEQN (SEQ ID NO: 272);
KTPEQNVELA (SEQ ID NO:273);
IEHLKTPEQNVELA (SEQ ID NO:274);
AELKADEKSH (SEQ ID NO:275);
AVILGDTRYG (SEQ ID NO:276);
AELKADEKSHAVILGDTRYG (SEQ ID NO:277);
EEKGTYHLAL (SEQ ID NO:278); or combinations thereof.

A 2086 Subfamily B protein, immunogenic portion thereof and/or biological equivalent thereof comprises any of the following amino acid sequences, in accordance with an embodiment embodiment of the present invention:

LITLESGEFQ (SEQ ID NO:279);
SALTALQTEQ (SEQ ID NO:280);
FQVYKQSHSA (SEQ ID NO:281);
LITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQ (SEQ ID NO:282);
IGDIAGEHTS (SEQ ID NO:283);
EHTSFDKLPK (SEQ ID NO:284);
IGDIAGEHTSFDKLPK (SEQ ID NO:285);

ATYRGTAFGS (SEQ ID NO:286);

DDAGGKLTYT (SEQ ID NO:287);

IDFAAKQGHG (SEQ ID NO:288);

KIEHLKSPEL (SEQ ID NO:289);

ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNV (SEQ ID NO: 290);

HAVISGSVLY (SEQ ID NO:291);

KGSYSLGIFG (SEQ ID NO:292);

VLYNQDEKGS (SEQ ID NO:293);

HAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFG (SEQ ID NO:294);

AQEVAGSAEV (SEQ ID NO:295);

IHHIGLAAKQ (SEQ ID NO:296);

VETANGIHHI (SEQ ID NO:297);

AQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO:298); or

VAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO:299).

The 2086 protein comprises the following consensus sequence and/or immunogenic portions thereof in accordance with an embodiment of the present invention.

2086 Protein Consensus Sequence (SEQ ID NO: 300):

CSSG—

GGGVxADIGxGLADALTxPxDxKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQGAE

KTxxxGD—

SLNTGKLKNDKxSRFDFxxxIxVDGxxITLxSGEFQxYKQxHSAxxALQ

xExxxxxxxxxxxxxxRxFxxxxxxGEHTxFxxLPxx-xAxYxGxAFxSDDxxGxLxYx

IDFxxKQGxGxIEHLKxPExNVxLAxxxxKxDEKxHAVIxGxxxYxxxEKGxYxLxx

xG

xxAQExAGxAxVxxxxxxHxIxxAxKQ

In the foregoing consensus sequence, the "x" represents any amino acid, the region from amino acid position 5 to amino acid position 9 is any of 0 to 5 amino acids, the region from amino acid position 67 to amino acid position 69 is any of 0 to 3 amino acids, and amino acid position 156 is any of 0 to 1 amino acid. The region from amino acid position 5 to amino acid position 9 preferably comprises 0, 4 or 5 amino acids. The region from amino acid position 67 to amino acid position 69 preferably comprises 0 or 3 amino acids. It should be particularly noted that this consensus sequence illustrates the high variability of the 2086 proteins. By way of theory, without intending to be bound thereto, it is believed that this high variability provides the advantageous and unexpected cross-reactivity.

According to an implementation of the present invention, the 2086 proteins are characterized as being immunogenic, nonpathogenic and non-strain specific. Moreover, according to a further implementation of the present invention, these proteins unexpectedly exhibit immunogenicity while being about 2% to about 40% nonconserved.

As used herein, the term "nonconserved" refers to the number of amino acids that may undergo insertions, substitution and/or deletions as a percentage of the total number of amino acids in a protein. For example, if a protein is 40% nonconserved and has, for example, 263 amino acids, then there are 105 amino acid positions in the protein at which amino acids may undergo substitution. Likewise, if a protein is 10% nonconserved and has, for example, about 280 amino acids, then there are 28 amino acid positions at which amino acids may undergo substitution. The 2086 proteins may also undergo deletion of amino acid residues without compromising the immunogenicity of the proteins.

Further, the 2086 proteins may be divided into subfamilies based upon homology at various regions. For example, without intending to be limited thereto, the consensus sequences for two such subfamilies, Subfamily A and Subfamily B, are provided below:

2086 Subfamily A sequence (SEQ ID 301)

CSSG—
GGGVAADIGxGLADALTxPxDxKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQGAEK

TxxxGD—
SLNTGKLKNDKxSRFDFxxxIxVDGQxITLxSGEFQIYKQxHSAVVALQI

EKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPxGKAEYHGKAFSSDDxxGx
LxYxID

FxxKQGxGxIEHLKTPEQNVELAxAELKADEKSHAVILGDTRYGxEEKGTYHL
ALxGDR

AQEIAGxATVKIxEKVHEIxIAxKQ

The reference "x" is any amino acid.

The region from amino acid position 5 to amino acid position 8 is any of 0 to 4 amino acids.

The region from amino acid position 66 to amino acid position 68 is any of 0 to 3 amino acids.

The region from amino acid position 5 to amino acid position 8 preferably comprises 0 or 4 amino acids. The region from amino acid position 66 to amino acid position 68 preferably comprises 0 or 3 amino acids.

In accordance with an implementation of the present invention, the 2086 protein from Subfamily A comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

KINNPDKIDSLINQ (SEQ ID NO:450);

DEKSHAVILG (SEQ ID NO:451);

KIGEKVHEIG (SEQ ID NO:452);

and combinations thereof.

In accordance with a further embodiment of the invention, the 2086 protein from Subfamily A comprises an amino acid sequence that is encoded by a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to any of the polynucleotides that encode any of SEQ ID NOS:450-452. A person of skill in the art would be able to identify and select polynucleotides (i.e., nucleic acid sequences) that encode any of SEQ ID NOS:450-452 and polynucleotides that hybridize under stringent conditions to any of the polynucleotides that encode any of SEQ ID NOS:450-452.

2086 Subfamily B (SEQ ID 302)

CSSGGGG—–
VxADIGxGLADALTAPLDHKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQGAE

KTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGxLITLESGEFQVYKQSHSAL TALQTEQ

xQDxExSxKMVAKRxFxIGDIAGEHTSFDKLPKxxxATYRGTAFGSDDAGGKL TYTIDF

AAKQGHGKIEHLKSPELNVxLAxxYIKPDEKxHAVISGSVLYNQDEKGSYSL GIFGxxA

QEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

The reference "x" is any amino acid.

The region from amino acid position 8 to amino acid position 12 is any of 0 to 5 amino acids.

The region from amino acid position 8 to amino acid position 12 preferably comprises 0 or 5 amino acids.

In accordance with an implementation of the present invention, the 2086 protein comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

MVAKRQFRIG (SEQ ID NO:444);

DIAGEHTSFDKLP (SEQ ID NO:445);

YTIDFAAKQG (SEQ ID NO:446);

GKIEHLKSPELNV (SEQ ID NO:447);

HAVISGSVLYNQ (SEQ ID NO:448);

AQEVAGSAEV (SEQ ID NO:449);

and combinations thereof.

In accordance with a further embodiment of the invention, the 2086 protein from Subfamily B comprises an amino acid sequence that is encoded by a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to any of the polynucleotides that encode a any of SEQ ID NOS: 444-449. A person of skill in the art would be able to identify and select polynucleotides (i.e., nucleic acid sequences) that encode any of SEQ ID NOS:444-449 and nucleotide sequences that hybridize under stringent conditions to any of the nucleotide sequences that encode any of SEQ ID NOS:444-449.

According to implementations of the present invention, the 2086 protein subfamilies may be further subdivided into clusters. For example, according to an implementation of the present invention, the following clusters are provided: even numbered SEQ ID NOS:2-12; even numbered SEQ ID NOS:14-24; even numbered SEQ ID NOS:26-42; even numbered SEQ ID NOS:50-60; even numbered SEQ ID NOS:62-108; even numbered SEQ ID NOS:110-138; even numbered SEQ ID NOS:140-156; even numbered SEQ ID NOS:158-174; and even numbered SEQ ID NOS: 224-252.

A polypeptide sequence of the invention may be identical to the reference sequence (e.g., even numbered SEQ ID NOS:2-252 or odd numbered SEQ ID NOS:331-443), that is, 100% identical, or it may include a number of amino acid alterations as compared to the reference sequence such that the % identity is less than 100%. Such alterations include at least one amino acid deletion, substitution,

including conservative and non-conservative substitution, or insertion. The alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference amino acid sequence or in one or more contiguous groups within the reference amino acid sequence.

Thus, the invention also provides proteins having sequence identity to the amino acid sequences contained in the Sequence Listing (i.e., even numbered SEQ ID NOS: 2-252 or odd numbered SEQ ID NOS:331-443). Depending on the particular sequence, the degree of sequence identity is preferably greater than 60% (e.g., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 99.9% or more). These homologous proteins include mutants and allelic variants.

In preferred embodiments of the invention, the 2086 proteins or other 2086 polypeptides (e.g., immunological portions and biological equivalents) generate bactericidal antibodies to homologous and at least one heterologous strain of meningococci. Specifically, the antibodies to the 2086 polypeptides passively protect infant rats from challenge, such as intranasal, with meningococci. In further preferred embodiments, the 2086 polypeptides exhibit such protection for infants rats for homologous strains and at least one heterologous strain. The polypeptide may be selected from the Sequence Summary above, as set forth in the even numbered SEQ ID NOS: 2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443, or the polypeptide may be any immunological fragment or biological equivalent of the listed polypeptides. Preferably, the polypeptide is selected from any of the even numbered SEQ ID NOS: 2-252 or the odd numbered SEQ ID NOS:331-443 in the Sequence Summary above.

This invention also relates to allelic or other variants of the 2086 polypeptides, which are biological equivalents. Suitable biological equivalents will exhibit the ability to (1) elicit bactericidal antibodies to homologous strains and at least one heterologous neisserial strain and/or gonococcal strain; (2) react with the surface of homologous strains and at least one heterologous neisserial and/or gonococcal strain; (3) confer passive protection against a live challenge; and/or (4) prevent colonization.

Suitable biological equivalents have at least about 60%, preferably at least about 70%, more preferably at least about 75%, even more preferably about 80%, even more preferably about 85%, even more preferably about 90%, even more preferably 95 % or even more preferably 98%, or even more preferably 99% similarity to one of the 2086 polypeptides specified herein (i.e., the even numbered SEQ ID NOS: 2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443), provided the equivalent is capable of eliciting substantially the same immunogenic properties as one of the 2086 proteins of this invention.

Alternatively, the biological equivalents have substantially the same immunogenic properties of one of the 2086 protein in the even numbered SEQ ID NOS: 2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443. According to embodiments of the present invention, the biological equivalents have the same immunogenic properties as the even numbered SEQ ID NOS: 2-252 or odd numbered SEQ ID NOS:331-443.

The biological equivalents are obtained by generating variants and modifications to the proteins of this invention. These variants and modifications to the proteins are obtained by altering the amino acid sequences by insertion, deletion or substitution of one or more amino acids. The amino acid sequence is modified, for example by substitution in order to create a polypeptide having substantially the same or improved qualities. A preferred means of introducing alterations comprises making predetermined mutations of the nucleic acid sequence of the polypeptide by site-directed mutagenesis.

Modifications and changes can be made in the structure of a polypeptide of the present invention and still obtain a molecule having *N. meningitidis* immunogencity. For example, without limitation, certain amino acids can be substituted for other amino acids, including nonconserved and conserved substitution, in a sequence without appreciable loss of immunogenicity. Because it is the interactive capacity and nature of a polypeptide that defines that polypeptide's biological functional activity, a number of amino acid sequence substitutions can be made in a polypeptide sequence (or, of course, its underlying DNA coding sequence) and nevertheless obtain a polypeptide with like properties. The present

invention contemplates any changes to the structure of the polypeptides herein, as well as the nucleic acid sequences encoding said polypeptides, wherein the polypeptide retains immunogenicity. A person of ordinary skill in the art would be readily able to modify the disclosed polypeptides and polynucleotides accordingly, based upon the guidance provided herein.

For example, certain variable regions have been identified where substitution or deletion is permissible The 2086 consensus sequence, as previously discussed, shows conserved and nonconserved regions of the 2086 family of proteins according to an implementation of the present invention.

In making such changes, any techniques known to persons of skill in the art may be utilized. For example, without intending to be limited thereto, the hydropathic index of amino acids can be considered. The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biologic function on a polypeptide is generally understood in the art. Kyte *et al.* 1982. *J. Mol. Bio.* 157:105-132.

Substitution of like amino acids can also be made on the basis of hydrophilicity, particularly where the biological functional equivalent polypeptide or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments. U.S. Pat. No. 4,554,101, incorporated herein by reference, states that the greatest local average hydrophilicity of a polypeptide, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity, *i.e.* with a biological property of the polypeptide.

Biological equivalents of a polypeptide can also be prepared using site-specific mutagenesis. Site-specific mutagenesis is a technique useful in the preparation of second generation polypeptides, or biologically functional equivalent polypeptides or peptides, derived from the sequences thereof, through specific mutagenesis of the underlying DNA. Such changes can be desirable where amino acid substitutions are desirable. The technique further provides a ready ability to prepare and test sequence variants, for example, incorporating one or more of the foregoing considerations, by introducing one or more nucleotide sequence changes into the DNA. Site-specific mutagenesis allows the production of mutants through

the use of specific oligonucleotide sequences which encode the DNA sequence of the desired mutation, as well as a sufficient number of adjacent nucleotides, to provide a primer sequence of sufficient size and sequence complexity to form a stable duplex on both sides of the deletion junction being traversed. Typically, a primer of about 17 to 25 nucleotides in length is preferred, with about 5 to 10 residues on both sides of the junction of the sequence being altered.

In general, the technique of site-specific mutagenesis is well known in the art. As will be appreciated, the technique typically employs a phage vector which can exist in both a single stranded and double stranded form. Typically, site-directed mutagenesis in accordance herewith is performed by first obtaining a single-stranded vector which includes within its sequence a DNA sequence which encodes all or a portion of the *N. meningitidis* polypeptide sequence selected. An oligonucleotide primer bearing the desired mutated sequence is prepared (*e.g.*, synthetically). This primer is then annealed to the single-stranded vector, and extended by the use of enzymes such as *E. coli* polymerase I Klenow fragment, in order to complete the synthesis of the mutation-bearing strand. Thus, a heteroduplex is formed wherein one strand encodes the original non-mutated sequence and the second strand bears the desired mutation. This heteroduplex vector is then used to transform appropriate cells such as *E. coli* cells and clones are selected which include recombinant vectors bearing the mutation. Commercially available kits come with all the reagents necessary, except the oligonucleotide primers.

2086 polypeptides include any protein or polypeptide comprising substantial sequence similarity and/or biological equivalence to a 2086 protein having an amino acid sequence from one of the even numbered SEQ ID NOS 2-252. In addition, a 2086 polypeptide of the invention is not limited to a particular source. Thus, the invention provides for the general detection and isolation of the polypeptides from a variety of sources. Also, the 2086 polypeptides can be prepared recombinantly, as is well within the skill in the art, based upon the guidance provided herein, or in any other synthetic manner, as known in the art.

It is contemplated in the present invention, that a 2086 polypeptide may advantageously be cleaved into fragments for use in further structural or functional

analysis, or in the generation of reagents such as 2086-related polypeptides and 2086-specific antibodies. This can be accomplished by treating purified or unpurified *N. meningitidis* polypeptides with a peptidase such as endoproteinase glu-C (Boehringer, Indianapolis, IN). Treatment with CNBr is another method by which peptide fragments may be produced from natural *N. meningitidis* 2086 polypeptides. Recombinant techniques also can be used to produce specific fragments of a 2086 protein.

"Variant" as the term is used herein, is a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide respectively, but retains essential properties. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical (*i.e.*, biologically equivalent). A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be a naturally occurring such as an allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis.

"Identity," as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. "Identity" and "similarity" can be readily calculated by known methods, including but not limited

to those described in Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. *Applied Math.*, 48:1073 (1988). Preferred methods to determine identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are codified in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package (Devereux, J., *et al* 1984), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S. F., *et al.*, 1990). The BLASTX program is publicly available from NCBI and other sources (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., *et al.*, 1990). The well known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

By way of example, without intending to be limited thereto, an amino acid sequence of the present invention may be identical to the reference sequences, even numbered SEQ ID NOS: 2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443; that is be 100% identical, or it may include a number of amino acid alterations as compared to the reference sequence such that the % identity is less than 100%. Such alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. The number of amino acid alterations for a given % identity is determined by multiplying the total number of amino acids in even numbered SEQ ID NOS:2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443 by the numerical percent of the respective percent identity

(divided by 100) and then subtracting that product from said total number of amino acids in any of even numbered SEQ ID NOS:2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443, or:

$$n_a = x_a - (x_a * y),$$

wherein n_a is the number of amino acid alterations, x_a is the total number of amino acids in even numbered SEQ ID NOS:2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443, and y is, for instance 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85% etc., and wherein any non-integer product of x.sub.a and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_a.

In preferred embodiments, the polypeptide above is selected from the proteins set forth in the even numbered SEQ ID NOS 2-252, such as mature processed form of a 2086 protein. The 2086 proteins or equivalents, etc. may be lipidated or non-lipidated.

ORF 2086 is expressible in *E. coli* with the native ORF 2086 signal sequence. However, it is desirable to find means to improve the expression of proteins. According to an embodiment of the present invention, a leader sequence produces a lipidated form of the protein. For example, the following describes the use of the signal sequence of the nontypable *Haemophilus influenzae* P4 protein to enhance expression.

The processing of bacterial lipoproteins begins with the synthesis of a precursor or prolipoprotein containing a signal sequence, which in turn contains a consensus lipoprotein processing/modification site. This prolipoprotein initially passes through the common Sec system on the inner membrane of Gram negative bacteria or on the membrane in Gram positive bacteria. Once placed in the membrane by the Sec system, the prolipoprotein is cleaved by signal peptidase II at the consensus site and the exposed N-terminal cysteine residue is glycerated and acylated. Hayashi et al. 1990. Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* Jun; 22(3):451-71; Oudega et al. 1993. *Escherichia coli* SecB, SecA, and SecY proteins are required for expression and membrane insertion of the bacteriocin release protein, a small lipoprotein. *J. Bacteriol.* Mar;175(5):1543-7; Sankaran et al. 1995. Modification of bacterial lipoproteins. *Methods Enzymol.* 250:683-97.

In Gram negative bacteria, transport of the lipidated protein to the outer membrane is mediated by a unique ABC transporter system with membrane specificity depending on a sorting signal at position 2 of the lipoprotein. Yakushi et al. 2000. A new ABC transporter mediating the detachment of lipid modified proteins from membranes. *Nat Cell Biol.* Apr;2(4):212-8.

Fusion with bacterial lipoproteins and their signal sequences has been used to display recombinant proteins on the surface of bacteria. U.S. Patent Numbers 5,583,038 and 6,130,085. Exchanging lipoprotein signal sequences can increase the production of the lipoprotein. De et al. 2000. Purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* palmitoylated pneumococcal surface adhesin A expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine.* Mar 6;18(17):1811-21.

Bacterial lipidation of proteins is known to increase or modify the immunological response to proteins. Erdile et al. 1993. Role of attached lipid in immunogenicity of Borrelia burgdorferi OspA. *Infect. Immun.* Jan;61(1):81-90; Snapper et al. 1995. Bacterial lipoproteins may substitute for cytokines in the humoral immune response to T cell-independent type II antigens. *J. Immunol.* Dec 15;155(12):5582-9. However, bacterial lipoprotein expression can be complicated by the stringency of the processing. Pollitt et al. 1986. Effect of amino acid substitutions at the signal peptide cleavage site of the *Escherichia coli* major outer membrane lipoprotein. *J. Biol. Chem.* Feb 5; 261(4):1835-7; Lunn et al. 1987. Effects of prolipoprotein signal peptide mutations on secretion of hybrid prolipo-beta-lactamase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* Jun 15;262(17):8318-24; Klein et al. 1988. Distinctive properties of signal sequences from bacterial lipoproteins. *Protein Eng.* Apr; 2(1):15-20. Bacterial lipoprotein expression is also complicated by other problems such as toxicity and low expression levels. Gomez et al. 1994. Nucleotide The *Bacillus subtilis* lipoprotein LplA causes cell lysis when expressed in *Escherichia coli*. *Microbiology.* Aug;140 (Pt 8):1839-45; Hansson et al. 1995. Expression of truncated and full-length forms of the Lyme disease Borrelia outer surface protein A in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* Feb; 6(1):15-24; Yakushi et al. 1997. Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer

membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* May; 179(9):2857-62.

The nontypable *Haemophilus influenzae* bacterium expresses a lipoprotein designated P4 (also known as protein "e"). The recombinant form of the P4 protein is highly expressed in *E. coli* using the native P4 signal sequence. U.S. Patent Number 5,955,580. When the native P4 signal sequence is substituted for the native ORF 2086 signal sequence in an expression vector in *E. coli*, the level of expression of ORF2086 is increased.

This concept of using the heterologous P4 signal sequence to increase expression is extendible to other bacterial lipoproteins. In particular, analysis of bacterial genomes leads to the identification of many ORFs as being of possible interest. Attempting to express each ORF with its native signal sequence in a heterologous host cell, such as *E. coli*, gives rise to a variety of problems inherent in using a variety of signal sequences, including stability, compatibility and so forth. To minimize these problems, the P4 signal sequence is used to express each ORF of interest. As described above, the P4 signal sequence improves the expression of the heterologous 2086 ORF. An expression vector is constructed by deleting the native signal sequence of the ORF of interest, and ligating the P4 signal sequence to the ORF. A suitable host cell is then transformed, transfected or infected with the expression vector, and expression of the ORF is increased in comparison to expression using the native signal sequence of the ORF.

The non-lipidated form is produced by a protein lacking the original leader sequence or a by a leader sequence which is replaced with a portion of sequence that does not specify a site for fatty acid acylation in a host cell.

The various forms of the 2086 proteins of this invention are referred to herein as "2086" protein, unless otherwise specifically noted. Also "2086 polypeptide" refers to the 2086 proteins as well as immunogenic portions or biological equivalents thereof as noted above, unless otherwise noted.

The full length isolated and purified *N. meningitidis* 2086 protein has an apparent molecular weight of about 28 to 35 kDa as measured on a 10 % to 20% gradient SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE). More specifically, this protein has

a molecular weight of about 26,000 to 30,000 daltons as measured by mass spectrometry.

Preferably, the 2086 polypeptides and nucleic acids encoding such polypeptides are used for preventing or ameliorating infection caused by *N. meningitidis* and/or other species.

Antibodies

The proteins of the invention, including the amino acid sequences of SEQ ID NOS: 2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443, their fragments, and analogs thereof, or cells expressing them, are also used as immunogens to produce antibodies immunospecific for the polypeptides of the invention. The invention includes antibodies to immunospecific polypeptides and the use of such antibodies to detect the presence of *N. meningitidis*, provide passive protection or measure the quantity or concentration of the polypeptides in a cell, a cell or tissue extract, or a biological fluid.

The antibodies of the invention include polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, and anti-idiotypic antibodies. Polyclonal antibodies are heterogeneous populations of antibody molecules derived from the sera of animals immunized with an antigen. Monoclonal antibodies are a substantially homogeneous population of antibodies to specific antigens. Monoclonal antibodies may be obtained by methods known to those skilled in the art, e.g., Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495-497 and U.S. Patent Number 4,376,110. Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, GILD and any subclass thereof.

Chimeric antibodies are molecules, different portions of which are derived from different animal species, such as those having variable region derived from a murine monoclonal antibody and a human immunoglobulin constant region. Chimeric antibodies and methods for their production are known in the art (Cabilly *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 81:3273-3277; Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Boulianne *et al.*, 1984, *Nature* 312:643-646; Cabilly *et al.*, European Patent Application 125023 (published November 14, 1984); Taniguchi *et al.*, European Patent Application 171496 (published February 19,

.1985); Morrison *et al.*, European Patent Application 173494 (published March 5, 1986); Neuberger *et al.*, PCT Application WO 86/01533 (published March 13, 1986); Kudo *et al.*, European Patent Application 184187 (published June 11, 1986); Morrison *et al.*, European Patent Application 173494 (published March 5, 1986); Sahagan *et al.*, 1986, *J. Immunol.* 137:1066-1074; Robinson *et al.*, PCT/US86/02269 (published May 7, 1987); Liu *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Sun *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Better *et al.*, 1988, *Science* 240:1041-1043). These references are hereby incorporated by reference in their entirety.

An anti-idiotypic (anti-Id) antibody is an antibody which recognizes unique determinants generally associated with the antigen-binding site of an antibody. An anti-Id antibody is prepared by immunizing an animal of the same species and genetic type (e.g., mouse strain) as the source of the monoclonal antibody with the monoclonal antibody to which an anti-Id is being prepared. The immunized animal will recognize and respond to the idiotypic determinants of the immunizing antibody by producing an antibody to these isotypic determinants (the anti-Id antibody).

Accordingly, monoclonal antibodies generated against the polypeptides of the present invention may be used to induce anti-Id antibodies in suitable animals. Spleen cells from such immunized mice can be used to produce anti-Id hybridomas secreting anti-Id monoclonal antibodies. Further, the anti-Id antibodies can be coupled to a carrier such as keyhole limpet hemocyanin (KLH) and used to immunize additional BALB/c mice. Sera from these mice will contain anti-anti-Id antibodies that have the binding properties of the final mAb specific for an R-PTPase epitope. The anti-Id antibodies thus have their idiotypic epitopes, or "idiotopes" structurally similar to the epitope being evaluated, such as *Streptococcus pyogenes* polypeptides.

The term "antibody" is also meant to include both intact molecules as well as fragments such as Fab which are capable of binding antigen. Fab fragments lack the Fc fragment of intact antibody, clear more rapidly from the circulation, and may have less non-specific tissue binding than an intact antibody (Wahl *et al.*, 1983, *J. Nucl. Med.* 24:316-325). It will be appreciated that Fab and other fragments of the

antibodies useful in the present invention may be used for the detection and quantitation of *N. meningitidis* polypeptides according to the methods for intact antibody molecules.

The antibodies of this invention, such as anti-iodiotypic ("anti-Id") antibodies, can be employed in a method for the treatment or prevention of *Neisseria* infection in mammalian hosts, which comprises administration of an immunologically effective amount of antibody, specific for a polypeptide as described above. The anti-Id antibody may also be used as an "immunogen" to induce an immune response in yet another animal, producing a so-called anti-anti-Id antibody. The anti-anti-Id may be epitopically identical to the original mAb which induced the anti-Id. Thus, by using antibodies to the idiotypic determinants of a mAb, it is possible to identify other clones expressing antibodies of identical specificity.

The antibodies are used in a variety of ways, e.g., for confirmation that a protein is expressed, or to confirm where a protein is expressed. Labeled antibody (e.g., fluorescent labeling for FACS) can be incubated with intact bacteria and the presence of the label on the bacterial surface confirms the location of the protein, for instance.

Antibodies generated against the polypeptides of the invention can be obtained by administering the polypeptides or epitope-bearing fragments, analogs, or cells to an animal using routine protocols. For preparing monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures are used.

Polynucleotides

As with the proteins of the present invention, a polynucleotide of the present invention may comprise a nucleic acid sequence that is identical to any of the reference sequences of even numbered SEQ ID NOS:330-442, that is be 100% identical, or it may include up to a number of nucleotide alterations as compared to the reference sequence. Such alterations are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion, and wherein said alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of

the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. The number of nucleotide alterations is determined by multiplying the total number of nucleotides in any of even numbered SEQ ID NOS:330-442 by the numerical percent of the respective percent identity (divided by 100) and subtracting that product from said total number of nucleotides in said sequence.

By way of example, without intending to be limited thereto, an isolated *N. meningitidis* polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that has at least 70% identity to any nucleic acid sequence of odd numbered SEQ ID NOS:1-253 and even numbered SEQ ID NOS:330-442; a degenerate variant thereof or a fragment thereof, wherein the polynucleotide sequence may include up to n_n nucleic acid alterations over the entire polynucleotide region of the nucleic acid sequence of odd numbered SEQ ID NOS:1-253 and even numbered SEQ ID NOS:330-442, wherein n_n is the maximum number of alterations and is calculated by the formula:

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y),$$

in which x_n is the total number of nucleic acids of any of odd numbered SEQ ID NOS:1-253 and even numbered SEQ ID NOS:330-442 and y has a value of 0.70, wherein any non-integer product of x_n and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting such product from x_n. Of course, y may also have a value of 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90% 0.95 for 95%, *etc.* Alterations of a polynucleotide sequence encoding the polypeptides comprising amino acid sequences of any of even numbered SEQ ID NOS:2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443 may create nonsense, missense or frameshift mutations in this coding sequence and thereby alter the polypeptide encoded by the polynucleotide following such alterations.

Certain embodiments of the present invention relate to polynucleotides (herein referred to as the "2086 polynucleotides" or "ORF2086 polynucleotides") which encode the 2086 proteins and antibodies made against the 2086 proteins. In preferred embodiments, an isolated polynucleotide of the present invention is a polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least about 95% identity

to a nucleotide sequence chosen from one of the odd numbered SEQ ID NOS:1-253 or even numbered SEQ ID NOS:330-442, a degenerate variant thereof, or a fragment thereof. As defined herein, a "degenerate variant" is defined as a polynucleotide that differs from the nucleotide sequence shown in the odd numbered SEQ ID NOS:1 and SEQ ID NOS:253 (and fragments thereof) due to degeneracy of the genetic code, but still encodes the same 2086 protein (*e.g.*, the even numbered SEQ ID NOS: 2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443) as that encoded by the nucleotide sequence shown in the odd numbered SEQ ID NOS: 1-253 and even numbered SEQ ID NOS:330-442.

In other embodiments, the polynucleotide is a complement to a nucleotide sequence chosen from one of the odd numbered SEQ ID NOS: 1-253 or even numbered SEQ ID NOS:330-442, a degenerate variant thereof, or a fragment thereof. In yet other embodiments, the polynucleotide is selected from the group consisting of DNA, chromosomal DNA, cDNA and RNA and may further comprises heterologous nucleotides. In another embodiment, an isolated polynucleotide hybridizes to a nucleotide sequence chosen from one of SEQ ID NOS: 1 -253 or even numbered SEQ ID NOS:330-442, a complement thereof, a degenerate variant thereof, or a fragment thereof, under high stringency hybridization conditions. In yet other embodiments, the polynucleotide hybridizes under intermediate stringency hybridization conditions.

It will be appreciated that the 2086 polynucleotides may be obtained from natural, synthetic or semi-synthetic sources; furthermore, the nucleotide sequence may be a naturally occurring sequence, or it may be related by mutation, including single or multiple base substitutions, deletions, insertions and inversions, to such a naturally occurring sequence, provided always that the nucleic acid molecule comprising such a sequence is capable of being expressed as 2086 immunogenic polypeptide as described above. The nucleic acid molecule may be RNA, DNA, single stranded or double stranded, linear or covalently closed circular form. The nucleotide sequence may have expression control sequences positioned adjacent to it, such control sequences usually being derived from a heterologous source. Generally, recombinant expression of the nucleic acid sequence of this invention

will use a stop codon sequence, such as TAA, at the end of the nucleic acid sequence.

The invention also includes polynucleotides capable of hybridizing under reduced stringency conditions, more preferably stringent conditions, and most preferably highly stringent conditions, to polynucleotides described herein. Examples of stringency conditions are shown in the Stringency Conditions Table below: highly stringent conditions are those that are at least as stringent as, for example, conditions A-F; stringent conditions are at least as stringent as, for example, conditions G-L; and reduced stringency conditions are at least as stringent as, for example, conditions M-R.

STRINGENCY CONDITIONS - TABLE I

Stringency Condition	Polynucleotide Hybrid	Hybrid Length (bp)[I]	Hybridization Temperature and Buffer[H]	Wash Temperature and Buffer[H]
A	DNA:DNA	> 50	65EC; 1xSSC -or- 42EC; 1xSSC, 50% formamide	65EC; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	< 50	T_B; 1xSSC	T_B; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67EC; 1xSSC -or- 45EC; 1xSSC, 50% formamide	67EC; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	< 50	T_D; 1xSSC	T_D; 1xSSC
E	RNA:RNA	> 50	70EC; 1xSSC -or- 50EC; 1xSSC, 50% formamide	70EC; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	< 50	T_F; 1xSSC	T_f; 1xSSC
G	DNA:DNA	> 50	65EC; 4xSSC -or- 42EC; 4xSSC, 50% formamide	65EC; 1xSSC
H	DNA:DNA	< 50	T_H; 4xSSC	T_H; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67EC; 4xSSC -or- 45EC; 4xSSC, 50% formamide	67EC; 1xSSC
J	DNA:RNA	< 50	T_J; 4xSSC	T_J; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70EC; 4xSSC -or- 50EC; 4xSSC, 50% formamide	67EC; 1xSSC
L	RNA:RNA	< 50	T_L; 2xSSC	T_L; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50EC; 4xSSC -or- 40EC; 6xSSC, 50%	50EC; 2xSSC

Stringency Condition	Polynucleotide Hybrid	Hybrid Length (bp)[I]	Hybridization Temperature and Buffer[H]	Wash Temperature and Buffer[H]
			formamide	
N	DNA:DNA	< 50	T_N; 6xSSC	T_N; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55EC; 4xSSC -or- 42EC; 6xSSC, 50% formamide	55EC; 2xSSC
P	DNA:RNA	< 50	T_P; 6xSSC	T_P; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60EC; 4xSSC -or- 45EC; 6xSSC, 50% formamide	60EC; 2xSSC
R	RNA:RNA	< 50	T_R; 4xSSC	T_R; 4xSSC

bp[I]: The hybrid length is that anticipated for the hybridized region(s) of the hybridizing polynucleotides. When hybridizing a polynucleotide to a target polynucleotide of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing polynucleotide. When polynucleotides of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the polynucleotides and identifying the region or regions of optimal sequence complementarities.

buffer[H]: SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10mM NaH_2PO_4, and 1.25mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes after hybridization is complete.

T_B through T_R: The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5-10EC less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m(EC) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). For hybrids between 18 and 49 base pairs in length, T_m(EC) = 81.5 + 16.6($\log_{10}[Na^+]$) + 0.41(%G+C) - (600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and $[Na^+]$ is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ($[Na^+]$ for 1xSSC = 0.165 M).

Additional examples of stringency conditions for polynucleotide hybridization are provided in Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

Cold Spring Harbor, NY, chapters 9 and 11, and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F.M. Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4, incorporated herein by reference.

The invention also provides polynucleotides that are fully complementary to these polynucleotides and also provides antisense sequences. The antisense sequences of the invention, also referred to as antisense oligonucleotides, include both internally generated and externally administered sequences that block expression of polynucleotides encoding the polypeptides of the invention. The antisense sequences of the invention comprise, for example, about 15-20 base pairs. The antisense sequences can be designed, for example, to inhibit transcription by preventing promoter binding to an upstream nontranslated sequence or by preventing translation of a transcript encoding a polypeptide of the invention by preventing the ribosome from binding.

The polynucleotides of the invention are prepared in many ways (e.g., by chemical synthesis, from DNA libraries, from the organism itself) and can take various forms (e.g., single-stranded, double-stranded, vectors, probes, primers). The term "polynucleotide" includes DNA and RNA, and also their analogs, such as those containing modified backbones.

According to further implementations of the present invention, the polynucleotides of the present invention comprise a DNA library, such as a cDNA library.

Fusion Proteins

The present invention also relates to fusion proteins. A "fusion protein" refers to a protein encoded by two, often unrelated, fused genes or fragments thereof. For example, fusion proteins comprising various portions of constant region of immunoglobulin molecules together with another immunogenic protein or part thereof. In many cases, employing an immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein is advantageous for use in therapy and diagnosis resulting in, for example, improved pharmacokinetic properties (*see, e.g.*, EP 0 232 262 A1). On the other hand, for some uses it would be desirable to be able to delete the Fc part after the fusion protein has been expressed, detected and purified. The 2086

polynucleotides of the invention are used for the recombinant production of polypeptides of the present invention, the polynucleotide may include the coding sequence for the mature polypeptide, by itself; or the coding sequence for the mature polypeptide in reading frame with other coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro- protein sequence, or other fusion peptide portions. For example, a marker sequence which facilitates purification of a 2086 polypeptide or fused polypeptide can be encoded (see Gentz *et al.*, 1989, incorporated herein by reference in its entirety). Thus, contemplated in an implementation of the present invention is the preparation of polynucleotides encoding fusion polypeptides permitting His-tag purification of expression products. The polynucleotide may also contain non-coding 5' and 3' sequences, such as transcribed, non-translated sequences, splicing and polyadenylation signals. Such a fused polypeptide can be produced by a host cell transformed/transfected or infected or infected with a recombinant DNA cloning vehicle as described below and it can be subsequently isolated from the host cell to provide the fused polypeptide substantially free of other host cell proteins.

Immunogenic Compositions

One aspect of the present invention provides immunogenic compositions which comprise at least one 2086 protein or a nucleic acid encoding said proteins. The foregoing have the ability to (1) elicit bactericidal antibodies to multiple strains; (2) react with the surface of multiple strains; (3) confer passive protection against a live challenge; and/or (4) prevent colonization.

The formulation of such immunogenic compositions is well known to persons skilled in this field. Immunogenic compositions of the invention preferably include a pharmaceutically acceptable carrier. Suitable pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents include any and all conventional solvents, dispersion media, fillers, solid carriers, aqueous solutions, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like. Suitable pharmaceutically acceptable carriers include, for example, one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. Pharmaceutically acceptable carriers may further comprise minor amounts

of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the antibody. The preparation and use of pharmaceutically acceptable carriers is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, use thereof in the immunogenic compositions of the present invention is contemplated.

Such immunogenic compositions can be administered parenterally, e.g., by injection, either subcutaneously or intramuscularly, as well as orally or intranasally. Methods for intramuscular immunization are described by Wolff *et al.* and by Sedegah *et al.* Other modes of administration employ oral formulations, pulmonary formulations, suppositories, and transdermal applications, for example, without limitation. Oral formulations, for example, include such normally employed excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, and the like, without limitation.

The immunogenic compositions of the invention can include one or more adjuvants, including, but not limited to aluminum hydroxide; aluminum phosphate; STIMULON™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA); MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; Corixa, Hamilton, MT), 529 (an amino alkyl glucosamine phosphate compound, Corixa, Hamilton, MT), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA); GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, Washington); N-acetyl-muramyl–L-theronyl-D-isoglutamine (thr-MDP); N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (CGP 11637, referred to as nor-MDP); N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphos-phoryloxy-ethylamine) (CGP 19835A, referred to as MTP-PE); and cholera toxin. Others which may be used are non-toxic derivatives of cholera toxin, including its A subunit, and/or conjugates or genetically engineered fusions of the *N. meningitidis* polypeptide with cholera toxin or its B subunit ("CTB"), procholeragenoid, fungal polysaccharides, including schizophyllan, muramyl dipeptide, muramyl dipeptide ("MDP") derivatives, phorbol esters, the heat labile toxin of *E. coli*, block polymers or saponins.

In certain preferred embodiments, the proteins of this invention are used in an immunogenic composition for oral administration which includes a mucosal adjuvant and used for the treatment or prevention of *N. meningitidis* infection in a human host. The mucosal adjuvant can be a cholera toxin; however, preferably, mucosal adjuvants other than cholera toxin which may be used in accordance with the present invention include non-toxic derivatives of a cholera holotoxin, wherein the A subunit is mutagenized, chemically modified cholera toxin, or related proteins produced by modification of the cholera toxin amino acid sequence. For a specific cholera toxin which may be particularly useful in preparing immunogenic compositions of this invention, see the mutant cholera holotoxin E29H, as disclosed in Published International Application WO 00/18434, which is hereby incorporated herein by reference in its entirety. These may be added to, or conjugated with, the polypeptides of this invention. The same techniques can be applied to other molecules with mucosal adjuvant or delivery properties such as *Escherichia coli* heat labile toxin (LT). Other compounds with mucosal adjuvant or delivery activity may be used such as bile; polycations such as DEAE-dextran and polyornithine; detergents such as sodium dodecyl benzene sulphate; lipid-conjugated materials; antibiotics such as streptomycin; vitamin A; and other compounds that alter the structural or functional integrity of mucosal surfaces. Other mucosally active compounds include derivatives of microbial structures such as MDP; acridine and cimetidine. STIMULON™ QS-21, MPL, and IL-12, as described above, may also be used.

The immunogenic compositions of this invention may be delivered in the form of ISCOMS (immune stimulating complexes), ISCOMS containing CTB, liposomes or encapsulated in compounds such as acrylates or poly(DL-lactide-co-glycoside) to form microspheres of a size suited to adsorption. The proteins of this invention may also be incorporated into oily emulsions.

Multiple Antigens

The immunogenic agents, including proteins, polynucleotides and equivalents of the present invention may be administered as the sole active immunogen in a immunogenic composition, or alternatively, the composition may

include other active immunogens, including other *Neisseria sp.* immunogenic polypeptides, or immunologically-active proteins of one or more other microbial pathogens (e.g. virus, prion, bacterium, or fungus, without limitation) or capsular polysaccharide. The compositions may comprise one or more desired proteins, fragments or pharmaceutical compounds as desired for a chosen indication. In the same manner, the compositions of this invention which employ one or more nucleic acids in the immunogenic composition may also include nucleic acids which encode the same diverse group of proteins, as noted above.

Any multi-antigen or multi-valent immunogenic composition is contemplated by the present invention. For example, the compositions of the present invention may a comprise combinations of two or more 2086 proteins, a combination of 2086 protein with one or more Por A proteins, a combination of 2086 protein with meningococcus serogroup A, C, Y and W135 polysaccharides and/or polysaccharide conjugates, a combination of 2086 protein with meningococcus and pneumococcus combinations, or a combination of any of the foregoing in a form suitable for mucosal delivery. Persons of skill in the art would be readily able to formulate such multi-antigen or multi-valent immunologic compositions.

The present invention also contemplates multi-immunization regimens wherein any composition useful against a pathogen may be combined therein or therewith the compositions of the present invention. For example, without limitation, a patient may be administered the immunogenic composition of the present invention and another immununological composition for immunizing against *S. Pneumoniae*, as part of a multi-immunization regimen. Persons of skill in the art would be readily able to select immunogenic compositions for use in conjunction with the immunogenic compositions of the present invention for the purposes of developing and implementing multi-immunization regimens.

Specific embodiments of this invention relate to the use of one or more polypeptides of this invention, or nucleic acids encoding such, in a composition or as part of a treatment regimen for the prevention or amelioration of *S. pneumonaie* infection. One can combine the 2086 polypeptides or 2086 polynucleotides with any

immunogenic composition for use against *S. pneumonaie* infection. One can also combine the 2086 polypeptides or 2086 polynucleotides with any other protein or polysaccharide-based meningococcal vaccine.

The 2086 polypeptides, fragments and equivalents can be used as part of a conjugate immunogenic composition; wherein one or more proteins or polypeptides are conjugated to a carrier in order to generate a composition that has immunogenic properties against several serotypes and/or against several diseases. Alternatively, one of the 2086 polypeptides can be used as a carrier protein for other immunogenic polypeptides.

The present invention also relates to a method of inducing immune responses in a mammal comprising the step of providing to said mammal an immunogenic composition of this invention. The immunogenic composition is a composition which is antigenic in the treated animal or human such that the immunologically effective amount of the polypeptide(s) contained in such composition brings about the desired immune response against *N. meningitidis* infection. Preferred embodiments relate to a method for the treatment, including amelioration, or prevention of *N. meningitidis* infection in a human comprising administering to a human an immunologically effective amount of the composition.

The phrase "immunologically effective amount," as used herein, refers to the administration of that amount to a mammalian host (preferably human), either in a single dose or as part of a series of doses, sufficient to at least cause the immune system of the individual treated to generate a response that reduces the clinical impact of the bacterial infection. This may range from a minimal decrease in bacterial burden to prevention of the infection. Ideally, the treated individual will not exhibit the more serious clinical manifestations of the bacterial infection. The dosage amount can vary depending upon specific conditions of the individual. This amount can be determined in routine trials or otherwise by means known to those skilled in the art.

Another specific aspect of the present invention relates to using as the immunogenic composition a vector or plasmid which expresses an protein of this invention, or an immunogenic portion thereof. Accordingly, a further aspect this

invention provides a method of inducing an immune response in a mammal, which comprises providing to a mammal a vector or plasmid expressing at least one isolated 2086 polypeptide. The protein of the present invention can be delivered to the mammal using a live vector, in particular using live recombinant bacteria, viruses or other live agents, containing the genetic material necessary for the expression of the polypeptide or immunogenic portion as a foreign polypeptide.

According to a further implementation of the present invention, a method is provided for diagnosing bacterial meningitis in a mammal comprising: detecting the presence of immune complexes in the mammal or a tissue sample from said mammal, said mammal or tissue sample being contacted with an antibody composition comprising antibodies that immunospecifically bind with at least one polypeptide comprising the amino acid sequence of any of the even numbered SEQ ID NOS: 2-252 and odd numbered SEQ ID NOS:331-443; wherein the mammal or tissue sample is contacted with the antibody composition under conditions suitable for the formation of the immune complexes.

Viral and Non-Viral Vectors

Preferred vectors, particularly for cellular assays *in vitro* and *in vivo*, are viral vectors, such as lentiviruses, retroviruses, herpes viruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, vaccinia virus, baculovirus, and other recombinant viruses with desirable cellular tropism. Thus, a nucleic acid encoding a 2086 protein or immunogenic fragment thereof can be introduced *in vivo*, *ex vivo*, or *in vitro* using a viral vector or through direct introduction of DNA. Expression in targeted tissues can be effected by targeting the transgenic vector to specific cells, such as with a viral vector or a receptor ligand, or by using a tissue-specific promoter, or both. Targeted gene delivery is described in PCT Publication No. WO 95/28494, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Viral vectors commonly used for *in vivo* or *ex vivo* targeting and therapy procedures are DNA-based vectors and retroviral vectors. Methods for constructing and using viral vectors are known in the art (*e.g.*, Miller and Rosman, *BioTechniques*, 1992, 7:980-990). Preferably, the viral vectors are replication-defective, that is, they are unable to replicate autonomously in the target cell.

Preferably, the replication defective virus is a minimal virus, *i.e.*, it retains only the sequences of its genome which are necessary for encapsulating the genome to produce viral particles.

DNA viral vectors include an attenuated or defective DNA virus, such as but not limited to herpes simplex virus (HSV), papillomavirus, Epstein Barr virus (EBV), adenovirus, adeno-associated virus (AAV), and the like. Defective viruses, which entirely or almost entirely lack viral genes, are preferred. Defective virus is not infective after introduction into a cell. Use of defective viral vectors allows for administration to cells in a specific, localized area, without concern that the vector can infect other cells. Thus, a specific tissue can be specifically targeted. Examples of particular vectors include, but are not limited to, a defective herpes virus 1 (HSV1) vector (Kaplitt *et al.*, *Molec. Cell. Neurosci.*, 1991, 2:320-330), defective herpes virus vector lacking a glyco-protein L gene, or other defective herpes virus vectors (PCT Publication Nos. WO 94/21807 and WO 92/05263); an attenuated adenovirus vector, such as the vector described by Stratford-Perricaudet *et al.* (*J. Clin. Invest.*, 1992, 90:626-630; see also La Salle *et al.* , *Science*, 1993, 259:988-990); and a defective adeno-associated virus vector (Samulski *et al.*, J. Virol., 1987, 61:3096-3101; Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 1989, 63:3822-3828; Lebkowski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8:3988-3996), each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

Various companies produce viral vectors commercially, including, but not limited to, Avigen, Inc. (Alameda, CA; AAV vectors), Cell Genesys (Foster City, CA; retroviral, adenoviral, AAV vectors, and lentiviral vectors), Clontech (retroviral and baculoviral vectors), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; adenoviral and AAV vectors), Genvec (adenoviral vectors), IntroGene (Leiden, Netherlands; adenoviral vectors), Molecular Medicine (retroviral, adenoviral, AAV, and herpes viral vectors), Norgen (adenoviral vectors), Oxford BioMedica (Oxford, United Kingdom; lentiviral vectors), and Transgene (Strasbourg, France; adenoviral, vaccinia, retroviral, and lentiviral vectors), incorporated by reference herein in its entirety.

Adenovirus vectors. Adenoviruses are eukaryotic DNA viruses that can be modified to efficiently deliver a nucleic acid of this invention to a variety of cell types. Various serotypes of adenovirus exist. Of these serotypes, preference is given, within the scope of the present invention, to using type 2 or type 5 human adenoviruses (Ad 2 or Ad 5) or adenoviruses of animal origin (*see* PCT Publication No. WO 94/26914). Those adenoviruses of animal origin which can be used within the scope of the present invention include adenoviruses of canine, bovine, murine (example: Mav1, Beard *et al.*, Virology, 1990, 75-81), ovine, porcine, avian, and simian (example: SAV) origin. Preferably, the adenovirus of animal origin is a canine adenovirus, more preferably a CAV2 adenovirus (*e.g.*, Manhattan or A26/61 strain, ATCC VR-800, for example). Various replication defective adenovirus and minimum adenovirus vectors have been described (PCT Publication Nos. WO 94/26914, WO 95/02697, WO 94/28938, WO 94/28152, WO 94/12649, WO 95/02697, WO 96/22378). The replication defective recombinant adenoviruses according to the invention can be prepared by any technique known to the person skilled in the art (Levrero *et al.*, *Gene*, 1991, 101:195; European Publication No. EP 185 573; Graham, EMBO J., 1984, 3:2917; Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 1977, 36:59). Recombinant adenoviruses are recovered and purified using standard molecular biological techniques, which are well known to persons of ordinary skill in the art.

Adeno-associated viruses. The adeno-associated viruses (AAV) are DNA viruses of relatively small size that can integrate, in a stable and site-specific manner, into the genome of the cells which they infect. They are able to infect a wide spectrum of cells without inducing any effects on cellular growth, morphology or differentiation, and they do not appear to be involved in human pathologies. The AAV genome has been cloned, sequenced and characterized. The use of vectors derived from the AAVs for transferring genes *in vitro* and *in vivo* has been described (*see*, PCT Publication Nos. WO 91/18088 and WO 93/09239; U.S. Patent Nos. 4,797,368 and 5,139,941; European Publication No. EP 488 528). The replication defective recombinant AAVs according to the invention can be prepared by cotransfecting a plasmid containing the nucleic acid sequence of interest flanked by

two AAV inverted terminal repeat (ITR) regions, and a plasmid carrying the AAV encapsidation genes (rep and cap genes), into a cell line which is infected with a human helper virus (for example an adenovirus). The AAV recombinants which are produced are then purified by standard techniques.

Retrovirus vectors. In another implementation of the present invention, the nucleic acid can be introduced in a retroviral vector, *e.g.*, as described in U.S. Patent No. 5,399,346; Mann *et al.*, *Cell*, 1983, 33:153; U.S. Patent Nos. 4,650,764 and 4,980,289; Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 1988, 62:1120; U.S. Patent No. 5,124,263; European Publication Nos. EP 453 242 and EP178 220; Bernstein *et al.*, *Genet. Eng.*,1985, 7:235; McCormick, *BioTechnology*, 1985, 3:689; PCT Publication No. WO 95/07358; and Kuo *et al.*, *Blood*, 1993, 82:845, each of which is incorporated by reference in its entirety. The retroviruses are integrating viruses that infect dividing cells. The retrovirus genome includes two LTRs, an encapsidation sequence and three coding regions (gag, pol and env). In recombinant retroviral vectors, the *gag*, *pol* and *env* genes are generally deleted, in whole or in part, and replaced with a heterologous nucleic acid sequence of interest. These vectors can be constructed from different types of retrovirus, such as, HIV, MoMuLV ("murine Moloney leukaemia virus" MSV ("murine Moloney sarcoma virus"), HaSV ("Harvey sarcoma virus"); SNV ("spleen necrosis virus"); RSV ("Rous sarcoma virus") and Friend virus. Suitable packaging cell lines have been described in the prior art, in particular the cell line PA317 (U.S. Patent No. 4,861,719); the PsiCRIP cell line (PCT Publication No. WO 90/02806) and the GP+envAm-12 cell line (PCT Publication No. WO 89/07150). In addition, the recombinant retroviral vectors can contain modifications within the LTRs for suppressing transcriptional activity as well as extensive encapsidation sequences which may include a part of the gag gene (Bender *et al.*, *J. Virol.*, 1987, 61:1639). Recombinant retroviral vectors are purified by standard techniques known to those having ordinary skill in the art.

Retroviral vectors can be constructed to function as infectious particles or to undergo a single round of transfection. In the former case, the virus is modified to retain all of its genes except for those responsible for oncogenic transformation properties, and to express the heterologous gene. Non-infectious viral vectors are

manipulated to destroy the viral packaging signal, but retain the structural genes required to package the co-introduced virus engineered to contain the heterologous gene and the packaging signals. Thus, the viral particles that are produced are not capable of producing additional virus.

Retrovirus vectors can also be introduced by DNA viruses, which permits one cycle of retroviral replication and amplifies transfection efficiency (*see* PCT Publication Nos. WO 95/22617, WO 95/26411, WO 96/39036 and WO 97/19182).

Lentivirus vectors. In another implementation of the present invention, lentiviral vectors can be used as agents for the direct delivery and sustained expression of a transgene in several tissue types, including brain, retina, muscle, liver and blood. The vectors can efficiently transduce dividing and nondividing cells in these tissues, and effect long-term expression of the gene of interest. For a review, *see*, Naldini, Curr. Opin. Biotechnol., 1998, 9:457-63; *see also* Zufferey, *et al.*, *J. Virol.*, 1998, 72:9873-80). Lentiviral packaging cell lines are available and known generally in the art. They facilitate the production of high-titer lentivirus vectors for gene therapy. An example is a tetracycline-inducible VSV-G pseudotyped lentivirus packaging cell line that can generate virus particles at titers greater than 106 IU/mL for at least 3 to 4 days (Kafri, *et al.*, *J. Virol.*, 1999, 73: 576-584). The vector produced by the inducible cell line can be concentrated as needed for efficiently transducing non-dividing cells *in vitro* and *in vivo*.

Non-viral vectors. In another implementation of the present invention, the vector can be introduced *in vivo* by lipofection, as naked DNA, or with other transfection facilitating agents (peptides, polymers, etc.). Synthetic cationic lipids can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection of a gene encoding a marker (Felgner, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84:7413-7417; Felgner and Ringold, Science, 1989, 337:387-388; see Mackey, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85:8027-8031; Ulmer *et al.*, *Science*, 1993, 259:1745-1748). Useful lipid compounds and compositions for transfer of nucleic acids are described in PCT Patent Publication Nos. WO 95/18863 and WO 96/17823, and in U.S. Patent No. 5,459,127. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting (see Mackey, *et. al.*, *supra*). Targeted peptides, *e.g.*, hormones or

neurotransmitters, and proteins such as antibodies, or non-peptide molecules could be coupled to liposomes chemically.

Other molecules are also useful for facilitating transfection of a nucleic acid *in vivo*, such as a cationic oligopeptide (*e.g.*, PCT Patent Publication No. WO 95/21931), peptides derived from DNA binding proteins (*e.g.*, PCT Patent Publication No. WO 96/25508), or a cationic polymer (*e.g.*, PCT Patent Publication No. WO 95/21931).

It is also possible to introduce the vector *in vivo* as a naked DNA plasmid. Naked DNA vectors for vaccine purposes or gene therapy can be introduced into the desired host cells by methods known in the art, *e.g.*, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, use of a gene gun, or use of a DNA vector transporter (*e.g.*, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267:963-967; Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 1988, 263:14621-14624; Canadian Patent Application No. 2,012,311; Williams *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88:2726-2730). Receptor-mediated DNA delivery approaches can also be used (Curiel *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 1992, 3:147-154; Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262:4429-4432). U.S. Patent Nos. 5,580,859 and 5,589,466 disclose delivery of exogenous DNA sequences, free of transfection facilitating agents, in a mammal. Recently, a relatively low voltage, high efficiency *in vivo* DNA transfer technique, termed electrotransfer, has been described (Mir *et al.* , *C.P. Acad. Sci.*, 1988, 321:893; PCT Publication Nos. WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175). Accordingly, additional embodiments of the present invention relates to a method of inducing an immune response in a human comprising administering to said human an amount of a DNA molecule encoding a 2086 polypeptide of this invention, optionally with a transfection-facilitating agent, where said polypeptide, when expressed, retains immunogenicity and, when incorporated into an immunogenic composition and administered to a human, provides protection without inducing enhanced disease upon subsequent infection of the human with *Neisseria sp.* pathogen, such as *N. meningitidis*. Transfection-facilitating agents are known in the art and include bupivicaine, and other local anesthetics (for examples see U.S. Patent No.

76

5,739,118) and cationic polyamines (as published in International Patent Application WO 96/10038), which are hereby incorporated by reference.

The present invention also relates to an antibody, which may either be a monoclonal or polyclonal antibody, specific for 2086 polypeptides as described above. Such antibodies may be produced by methods which are well known to those skilled in the art.

Bacterial Expression Systems and Plasmids

This invention also provides a recombinant DNA molecule, such as a vector or plasmid, comprising an expression control sequence having promoter sequences and initiator sequences and a nucleotide sequence which codes for a polypeptide of this invention, the nucleotide sequence being located 3' to the promoter and initiator sequences. In yet another aspect, the invention provides a recombinant DNA cloning vehicle capable of expressing a 2086 polypeptide comprising an expression control sequence having promoter sequences and initiator sequences, and a nucleotide sequence which codes for a 2086 polypeptide, the nucleotide sequence being located 3' to the promoter and initiator sequences. In a further aspect, there is provided a host cell containing a recombinant DNA cloning vehicle and/or a recombinant DNA molecule as described above. Suitable expression control sequences and host cell/cloning vehicle combinations are well known in the art, and are described by way of example, in Sambrook *et al.* (1989).

Once recombinant DNA cloning vehicles and/or host cells expressing a desired *a* polypeptide of this invention have been constructed by transforming, transfecting or infecting such cloning vehicles or host cells with plasmids containing the corresponding 2086 polynucleotide, cloning vehicles or host cells are cultured under conditions such that the polypeptides are expressed. The polypeptide is then isolated substantially free of contaminating host cell components by techniques well known to those skilled in the art.

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those skilled in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be

considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in view of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

EXAMPLES

Example 1

Identification of a neisserial membrane protein extract capable of eliciting bactericidal antibodies against heterologous strains:

Referring to Table II below, LOS-depleted outer membrane protein preparations have been shown to elicit bactericidal antibodies. These antibodies are often directed towards the PorA of the respective strain. LOS-depleted outer membrane preparations from serogroup B meningococcal strain 8529 (B:15:P1.7b,3) are unusual in this manner because they unexpectedly elicit bactericidal antibodies to several heterologous strains.

TABLE II

BC Activity of Anti-sOMPS Against Different Strains of *N. meningitidis*

Anti-serum Week 6	H44/76	5315	H355	M982	880049	8529*	NMB
Serosubtype	P1.7,16	P1.5	P1.15	P1.9	P1.4	P1.3	P1.5,2
sOMPs H44/76 25µg QS-21 20µg	1,000	< 50	< 50	< 50	< 50	980	< 50
sOMPs 5315 25µg QS-21 20µg	50	< 50	<50	< 50	< 50	2170	< 50
sOMPs H355 25µg QS-21 20µg	< 50	< 50	450	< 50	< 50	860	< 50
sOMPs M982 25µg QS-21 20µg	92	< 50	< 50	300	< 50	1100	< 50
sOMPs 880049 25µg QS-21 20µg	50	< 50	< 50	< 50	< 50	1190	< 50
sOMPs 8529 25µg QS-21 20µg	1,000	< 50	450	50	215	>4050 (81.7)	< 50
sOMPs 2996 25µg QS-21 20µg	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	790	148
Whole-cell control serum 25µg 3DMPL 25µg	450	50	100	500	150	>1350 (66.0)	952

To facilitate the isolation and characterization of the antigen(s) responsible for eliciting heterologous bactericidal antibodies, we sought to identify which detergent optimally extracted the antigen(s).

Strains and culture conditions.

N. meningitidis strain 8529 from a frozen vial was streaked onto a GC plate. (The meningococcal strain 8529 was received from The RIVM, Bilthoven, The Netherlands). The plate was incubated at 36C/5%CO_2 for 7.5h. Several colonies were used to inoculate a flask containing 50 mL of modified Frantz medium + GC supplement. The flask was incubated in an air shaker at 36°C and agitated at 200 RPM for 4.5h. 5 mL was used to inoculate a Fernbach flask containing 450 mL of modified Frantz medium + GC supplement. The flask was incubated in an air shaker at 36°C and agitated at 100 RPM for 11h. The entire 450 mL was used to inoculate 8.5 L of modified Frantz medium+ GC supplement in a 10 L fermentor.

Composition of Modified Frantz Medium:

Glutamic acid	1.3 g/L
Cysteine	0.02
Sodium phosphate, dibasic, 7 hydrate	10
Potassium chloride	0.09
Sodium chloride	6
Ammonium chloride	1.25
Dialyzed yeast extract (YE)	40 ml

(25% YE soln. dialyzed against 5 volumes of dH_2O overnight, then autoclaved)

GC supplement 100X, filter sterilize

Dextrose	400 g/L
Glutamic acid	10
Cocarboxylase	0.02
Ferric nitrate	0.5

The following parameters were controlled during fermentation: Temperature=36°C ; pH=7.4; Dissolved Oxygen=20%. Several drops of P-2000

antifoam were added to control foaming. The culture was grown to stationary phase. Cells were harvested by centrifugation at OD650=5.25. A total of 100-300 grams of wet cell paste is typically harvested from ~8.5L of culture.

Partial purification of outer membrane protein fractions from meningococci which elicit heterologous bactericidal antibodies:

100 gms wet weight of cells were suspended, to a volume five times the wet weight, with 10mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 1mM Na2EDTA and lysed by passage through a 110Y microfluidizer equipped with a chamber at ~18,000 psi. The cell lysate was clarified and the cell envelope isolated by centrifugation at 300,000 x g for 1 hour at 10°C. The cell envelopes were washed 2X with the same buffer by suspension with a homogenizer followed by centrifugation as above. The cell envelopes were then extracted with 320mL of 1% (w/v) Triton X-100 in 10mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$. Referring to Table III below, results from sequential differential detergent extraction using Triton X-100 and Zwittergent 3-14 followed by immunization of mice, allowed us to determine that the Triton extracts optimally extracted the candidate(s) of interest. This Triton X-100 extract, eliciting bactericidal antibody response against 4 out of five strains listed in table III, was then fractionated by preparative isoelectric focusing (IEF) in a BioRad Rotophor unit. Ampholyte concentrations were 1% pH 3-10 mixed with 1% pH 4-6. As shown in Table III, several fractions were found to elicit a heterologous bactericidal response. The fractions obtained from IEF, which focused in the pH range of 5.5-7.8, elicited a heterologous response to the most strains as determined by the bactericidal assay. The pooled IEF fractions were concentrated and the ampholytes removed by ethanol precipitation. A further purification was achieved by adsorbing some of the proteins obtained in the pH range of about 5.5-7.8 on an anion exchange column and comparing the bactericidal activity obtained after immunizing mice with the adsorbed and unadsorbed proteins. Referring again to Table II, while many proteins were adsorbed to the anion exchange resin, the proteins which were not adsorbed by the column elicited more heterologous bactericidal antibodies.

80

TABLE III

		BC_{50} Target Strain				
Method	Fraction	H44/76	880049	H355	539*	M982
LOS-depleted	sOMPs	1,000	215	450	NC	50
Detergent Extractions	Cytoplasmic Extract	200	NT	NT	NT	NT
	TX-100	>800	>800	>800	>800	<25
	Zwittergent 3-12	400	>25	100	400	<25
	Zwittergent 3-14	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14 + NaCl	<25	NT	NT	NT	NT
	Sarcosyl	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14 + heat	<25	NT	NT	NT	NT
Preparative IHF	Fractions 1-3 (pH 2.3-3.9)	50	NT	NT	NT	NT
	Fraction 4 (pH 4.1)	>800	<25	100	<25	NT
	Fraction 5 (pH 4.3)	>800	<25	100	200	NT
	Fraction 6 (pH 4.5)	400	NT	NT	NT	NT
	Fraction 7 (pH 4.8)	<25	NT	NT	NT	NT
	Fractions 8-9 (pH 5.0-5.3)	<25	NT	NT	NT	NT
	Fractions 10-17 (pH 5.5-7.8)	>800	200	<800	<800	NT
Anion Exchange	Adsorbed	400	NT	100	100	NT
	Unadsorbed	>6,400	NT	<800	<800	NT

NT: not tested

*Clinical isolate 539 is a homologous strain to 8529, isolated from the same outbreak

As shown in FIG. 1A, two major proteins were present in the unadsorbed fraction as determined by SDS-PAGE. To identify these proteins, two types of analysis were performed. One analysis was to perform limited proteolytic degradation (See FIG. 1A, and FIG. 1B) followed by isolation of peptides and direct protein sequencing. The other analysis was to perform SDS-PAGE followed by gel excision, proteolytic digestion, and LC-MS/MS (Liquid Chromotography tandem Mass Spectrometry), (see FIG. 3) to obtain mass spectral information on the components of the preparations of interest. (See peptide mapping and sequencing methods described later in this section)

The *N. meningitidis* A Sanger genomic sequence was analyzed using the methods and algorithms described in Zagursky and Russell, 2001, *BioTechniques*, 31:636-659. This mining analysis yielded over 12,000 possible Open Reading Frames (ORFs). Both the direct sequence data and the mass spectral data described above indicated that the major components of the unadsorbed fraction were the products of several ORFs present in an analysis of the Sanger database. The three

predominant proteins identified by this methodology correspond to ORFs 4431, 5163 and 2086, (see FIGS. 1B and 3).

Although ORF 4431 was the most predominant protein identified in the fractions, mouse antibodies to recombinant lipidated 4431 were not bactericidal and did not provide a protective response in an animal model. Additional analysis of ORF 5163 is in progress.

The second most predominant component of the preparations described herein corresponds to the product of ORF 2086.

Immunogenicity Methods:

Preparation of antisera:

Except where noted, protein compositions/vaccines were formulated with 25μg of total protein and were adjuvanted with 20μg QS-21: A 0.2mL dose was administered by subcutaneous (rump) injection to 6-8 week old female Swiss-Webster mice at week 0 and 4. Bleeds were collected at week 0 and 4, and a final exsanguination bleed was performed on week 6.

Bactericidal assay:

Bactericidal assays were performed essentially as described (See Mountzouros and Howell, 2000, *J. Clin. Microbiol.* 38(8):2878-2884). Complement-mediated antibody-dependent bactericidal titers for the SBA were expressed as the reciprocal of the highest dilution of test serum that killed ≥ 50% of the target cells introduced into the assays (BC_{50} titer).

Methods used to identify 2086 protein:

Cyanogen Bromide cleavage and direct sequencing of fragments:

Cyanogen Bromide cleavage of Anion Exchange Unadsorbed Fraction (AEUF). The AEUF was precipitated with 90% cold ethanol and was solubilized with 10mg/mL cyanogen bromide in 70% formic acid to a protein concentration of 1mg/mL. The reaction was performed overnight at room temperature in the dark. The cleaved products were dried down by speed vacuum, and the pellet was solubilized with HE/0.1% reduced TX-100. SDS-PAGE followed by N-terminal amino acid sequencing were used to identify the components of this fraction.

Protease digestion/reverse phase/N-terminal sequencing to identify components:

The AEUF was digested with either GluC (V8), LysC or ArgC. The protein to enzyme ratio was 30 μg protein to 1μg enzyme. The digestion was carried out at 37°C overnight. The digested protein mixture (30 μg) was passed over a seven micron Aquapore RF-300 column and was eluted with a gradient of 10-95% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid, and peaks were collected manually. A no protein blank was also run, and the peaks from this were subtracted from the sample chromatogram. Peaks occurring only in the sample run were analyzed by mass spectrometer, and those samples giving a clear mass were analyzed for N-terminal amino acid sequencing.

N-terminal amino acid sequencing:

For bands excised from a blot, the protein sample is transferred from an SDS gel to a PVDF membrane, stained with Amido Black (10% acetic acid, 0.1% amido black in deionized water) and destained in 10% acetic acid. The desired protein band is then excised from all ten lanes using a methanol cleaned scalpel or mini-Exacto knife and placed in the reaction cartridge of the Applied Biosystems 477A Protein Sequencer. For direct sequencing of samples in solution, the Prosorb cartridge is assembled and the PVDF wetted with 60 μL of methanol. The PVDF is rinsed with 50 μL of deionized water and the sample (50 μL) is loaded to the PVDF. After 50 μL of deionized water is used to rinse the sample, the Prosorb PVDF is punched out, dried, and placed in the reaction cartridge of the Applied Biosystems 477A Protein Sequencer. For both methods, the Applied Biosystems N-terminal Sequencer is then run under optimal blot conditions for 12 or more cycles (1 cycle Blank, 1 cycle Standard, and 10 or more cycles for desired residue identification) and PTH-amino acid detection is done on the Applied Biosystems 120A PTH Analyzer. The cycles are collected both on an analog chart recorder and digitally via the instrument software. Amino acid assignment is done using the analog and digital data by comparison of a standard set of PTH-amino acids and their respective retention times on the analyzer (cysteine residues are destroyed during conversion and are not detected). Multiple sequence information can be obtained from a single

residue and primary versus secondary assignments are made based on signal intensity.

LC-MS/MS

Protein samples purified by IEF were further analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were visualized by Coomassie blue staining, and bands of interest were excised manually, then reduced, alkylated and digested with trypsin (Promega, Madison, WI) *in situ* using an automated in-gel tryptic digestion robot (1). After digestion, peptide extracts were concentrated to a final volume of 10-20 μL using a Savant Speed Vac Concentrator (ThermoQuest, Holdbrook, NY).

Peptide extracts were analyzed on an automated microelectrospray reversed phase HPLC. In brief, the microelectrospray interface consisted of a Picofrit fused silica spray needle, 50 cm length by 75 um ID, 8um orifice diameter (New Objective, Cambridge MA) packed with 10 um C18 reversed-phase beads (YMC, Wilmington, NC) to a length of 10 cm. The Picofrit needle was mounted in a fiber optic holder (Melles Griot, Irvine, CA) held on a home-built base positioned at the front of the mass spectrometer detector. The rear of the column was plumbed through a titanium union to supply an electrical connection for the electrospray interface. The union was connected with a length of fused silica capillary (FSC) tubing to a FAMOS autosampler (LC-Packings, San Francisco, CA) that was connected to an HPLC solvent pump (ABI 140C, Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The HPLC solvent pump delivered a flow of 50 μL /min which was reduced to 250 nL/min using a PEEK microtight splitting tee (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA), and then delivered to the autosampler using an FSC transfer line. The LC pump and autosampler were each controlled using their internal user programs. Samples were inserted into plastic autosampler vials, sealed, and injected using a 5μL sample loop.

Microcapillary HPLC-mass spectrometry:

Extracted peptides from in-gel digests were separated by the microelectrospray HPLC system using a 50 minute gradient of 0-50% solvent B (A: 0.1M HoAc, B: 90% MeCN/0.1M HoAc). Peptide analyses were done on a

Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer (ThermoQuest, San Jose, CA) operating at a spray voltage of 1.5 kV, and using a heated capillary temperature of 150 °C. Data were acquired in automated MS/MS mode using the data acquisition software provided with the instrument. The acquisition method included 1 MS scan (375-1200 m/z) followed by MS/MS scans of the top 3 most abundant ions in the MS scan. The dynamic exclusion and isotope exclusion functions were employed to increase the number of peptide ions that were analyzed (settings: 3 amu = exclusion width, 3 min = exclusion duration, 30 secs = pre-exclusion duration, 3 amu = isotope exclusion width). Automated analysis of MS/MS data was performed using the SEQUEST computer algorithm incorporated into the Finnigan Bioworks data analysis package (ThermoQuest, San Jose, CA) using the database of proteins derived from the complete genome of *N. meningitidis* (from Sanger). The results of the study are illustrated in FIG. 3.

Example 2

Cloning of Recombinant Lipidated P2086 (rLP2086):

A.) Native Leader Sequence:

Source materials:

The ORF 2086 gene was amplified by PCR from a clinical isolate of a serogroup B *Neisseria meningitidis* strain designated 8529. The serogroup, serotype and serosubtype of this strain is shown in parentheses; 8529 (B:15, P1:7b,3). This meningococcal strain was received from The RIVM, Bilthoven, The Netherlands. The mature 2086 protein gene sequence from meningococcal strain 8529 is provided herein as SEQ ID. NO. 212.

PCR Amplification and Cloning Strategy:

A visual inspection of ORF 2086 indicated that this gene had a potential lipoprotein signal sequence. Additional analysis using a proprietary Hidden Markov Model Lipoprotein algorithm confirmed that ORF 2086 contains a lipoprotein signal sequence. In order to recombinantly express P2086 in a more native-like conformation, oligonucleotide primers were designed to amplify the full length gene with the lipoprotein signal sequence intact and were based on an analysis of the Sanger sequence for *N. meningitidis* A ORF 2086, (5' primer – CT ATT CTG CAT

ATG ACT AGG AGC and 3' primer – GCGC GGATCC TTA CTG CTT GGC GGC AAG ACC), which are SEQ ID NO. 304 (Compound No. 4624) and SEQ ID NO. 303 (Compound No. 4623), respectively (See also Table IV herein). The 2086 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) [ABI 2400 thermal cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA] from *N. meningitidis* strain 8529. The correct size amplified product was ligated and cloned into pCR2.1-TOPO (Invitrogen). The plasmid DNA was restriction digested with NdeI and BamHI, gel purified and ligated into pET-27b(+) vector (Novagen).

Oligonucleotide primers described herein, were synthesized on a PerSeptive Biosystems oligonucleotide synthesizer, Applied Biosystems, Foster City CA, using β-Cyanoethylphosphoramidite chemistry, Applied Biosystems, Foster City CA. The primers used for PCR amplification of the ORF 2086 gene families are listed in Table IV, which shows non-limiting examples of primers of the present invention.

TABLE IV: PRIMERS

SEQ ID NO. (Compound No.)	Primer	Sequence	Restriction sites
303 (4623)	Reverse	GCGCGGATCCTTACTGCTTGGCGGCAAGACC	BamHI
304 (4624)	Forward	CTATTCTGCATATGACTAGGAGC	NdeI
305 (4625)	Forward	AGCAGCGGAGGCGGCGGTGTC	
306 (5005)	Forward	TGCCGATGCACTAACCGCACC	
307 (5007)	Reverse	CGTTTCGCAACCATCTTCCCG	
308 (5135)	Reverse	GAGATCTCACTCACTCATTACTGCTTGGCGGCAAGACCGATATG	BglII
309 (5658)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGGGGTGGTGTCGCC	BamHI
310 (5660)	Reverse	GCGCATGCTTACTGCTTGGCGGCAAGACCGATATG	SphI
311 (6385)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGAAGC	BamHI
312 (6406)	Forward	GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGGGGTGGTGTCGCCGCCGAYATWGGTGCGGGGCTTGCCG	BglII and NdeI
313 (6470)	Forward	CTATTCTGCGTATGACTAG	
314 (6472)	Reverse	GTCCGAACGGTAAATTATCGTG	
315 (6473)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCC	BamHI
316	Forward	GAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCGGCG	BglII and

SEQ ID NO. (Compound No.)	Primer	Sequence	Restriction sites
(6474)		GAAGC	NdeI
317 (6495)	Forward	GACAGCCTGATAAACC	
318 (6496)	Reverse	GATGCCGATTTCGTGAACC	
319 (6543)	Reverse	GCGCATGCCTACTGTTTGCCGGCGATG	SphI
320 (6605)	Reverse	GAGATCTCACTCACTCACTACTGTTTGCC GGCGATGCCGATTTC	BglII
321 (6721)	Forward	GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCG GCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCACCGCC GACATAGGCACG	BglII and NdeI

rLP2086 lipoprotein expression utilizing native leader sequence:

Referring to FIG. 5, plasmid pPX7340 was transformed/transfected or infected into BLR(DE3) pLysS host cells (Life Sciences). One transformant was selected and inoculated into 50 mL of Terrific Broth containing 2% glucose, kanamycin (30μg/mL), chloramphenicol (30μg/mL), and tetracycline (12μg/mL). The OD600 for the overnight culture was 6.0. The overnight culture was diluted out in 1 liter of Terrific Broth with 1% glycerol and the same antibiotics. The starting OD600 was 0.4. After 2 hours the OD600 was 1.6 and a pre-induced sample was taken. Cells equivalent to an OD600=1 were centrifuged and the supernatant was removed. The whole cell pellet was resuspended in 150μL Tris-EDTA buffer and 150μL of 2x SDS-PAGE sample buffer. IPTG was added to a final concentration of 1mM. After 3.5 hours a post-induced sample was taken as described and analyzed on SDS-PAGE (See FIG. 4).

Purification of rLP2086:

The rLP2086 was solubilized from *E. coli* following differential detergent extraction. Unlike the P2086 in its native environment, the rLP2086 was not significantly solubilized by Triton X-100 or Zwittergent 3-12. The bulk of the rLP2086 was solubilized with sarcosyl, indicating that it interacts with the outer membrane components of *E. coli* differently than it does in *N. meningitidis*. Once solubilized the rLP2086 was purified similarly to the native protein in that many of the contaminating *E. coli* proteins could be removed by adsorbtion to an anion exchange resin at pH 8. Despite being greater than one half a pH unit above its

theoretical pI, the rLP2086 remained unadsorbed at pH 8. Further purification was achieved by adsorbtion of the rLP2086 to a cation exchange resin at pH 4.5.

The homogeneity of the rLP2086 is shown in FIG. 2 following SDS-PAGE. The mass of rLP2086 was determined by MALDI-TOF mass spectral analysis to be 27,836. This mass differs from the theoretical mass of 27,100 by 736, which approximates the mass of the N-terminal lipid modification common to bacterial lipoproteins. Both native and rLP2086 appear to be outer membrane lipoproteins. Attempts with N-terminal sequencing were blocked and this is consistent with the terminal modification.

Purification Methods:

Frozen pellets of BLR DE3 pLysS cells expressing P2086 were resuspended in 10mM HEPES-NaOH/1mM EDTA/1μg/mL Pefabloc SC protease inhibitor (Roche) pH 7.4 (HEP) at 20mL/g wet cell weight and lysed by microfluidizer (Microfluidics Corporation Model 110Y). The cell lysate was centrifuged at 150,000 x g for one hour. The pellet was washed twice with HEP and centrifuged twice, and the resulting membrane pellet was frozen overnight. The pellet was solubilized with 10mM HEPES-NaOH/1mM MgCl2/1%TX-100 pH 7.4 for 30 minutes, followed by centrifugation at 150,000 x g for 30 minutes. This was repeated three times. The membrane pellet was washed as above twice with 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Zwittergent 3-12 pH 8, followed by two washes each of 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Zwittergent 3-14 pH 8 and 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Zwittergent 3-14/ 0.5M NaCl pH 8.

The rLP2086 was then solubilized with 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/ 1% sarcosyl pH 8. This sarcosyl extract was adjusted to 1% Zwittergent 3-14 (Z3-14) and dialyzed twice against a 30 fold excess of 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Z3-14. The dialyzed rLP2086 extract was precipitated with 90% ethanol to remove remaining sarcosyl, and solubilized with 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/ 1% Z3-14 pH 8 (TEZ). Insoluble material was removed by centrifugation, the supernatant was passed over an anion exchange chromatography column, and rLP2086 was collected in the unbound fraction. The unbound material was then dialyzed twice against a 30 fold excess of 25mM NaAc/1% Z3-14 pH 4.5, and passed over a cation exchange

chromatography column. The rLP2086 was eluted with a 0-0.3M NaCl gradient and analyzed by SDS-PAGE (Coomassie stain). The rLP2086 pool was determined to be 84% pure by laser densitometry.

Surface Reactivity and Bactericidal Activity of Antisera to rLP2086 Subfamily B.

Referring to Table VII, antisera to purified rLP2086 from the Subfamily B strain 8529, demonstrated surface reactivity to all ten 2086 Subfamily B strains tested by whole cell ELISA. Bactericidal activity was detected against nine of ten 2086 Subfamily B strains expressing heterologous serosubtype antigens, PorAs. These strains are representative of strains causing serogroup B meningococcal disease throughout western Europe, the Americas, Australia, and New Zealand. The only strain which was not killed in the bactericidal assay, 870227, reacted strongly with the anti-rLP2086 (Subfamily B) sera by whole cell ELISA, indicating that this strain expresses a protein with epitopes in common to P2086.

The 2086 Subfamily A strains listed in Table VII, were also tested for surface reactivity by whole cell ELISA. Two out of three of these strains appeared to have a very low level of reactivity, indicating that some 2086 Subfamily A strains may not be cross-reactive with antibodies raised to rLP2086 Subfamily B. The PCR amplification procedure used to identify the 2086 Subfamily B gene from strain 8529 was also performed on strains 870446, NMB and 6557. No 2086 Subfamily B PCR amplified product was detected.

Immunogenicity Methods :

Preparation of antisera:

Vaccines were formulated as described previously in Example 1. However, a 10 μg dose was used.

Whole cell enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA):

N. meningitidis whole cell suspensions were diluted to an optical density of 0.1 at 620nm in sterile 0.01M phosphate, 0.137M NaCl, 0.002M KCl (PBS). From this suspension, 0.1mL were added to each well of Nunc Bac T 96 well plates (Cat# 2-69620). Cells were dried on the plates at room temperature for three days, then were covered, inverted and stored at 4°C. Plates were washed three times with wash

buffer (0.01M Tris-HCl,0.139M NaCl/KCl,0.1% dodecylpoly(oxyethylereneglycolether)$_n$ n=23 (Brij-35®, available from ICI Americas, Inc., Wilmington, Delaware), pH 7.0-7.4). Dilutions of antisera were prepared in PBS, 0.05% Tween-20/Azide and 0.1mL was transferred to the coated plates. Plates were incubated for two hours at 37°C. Plates were washed three times in wash buffer. Goat-anti-mouse IgG AP (Southern Biotech) was diluted at 1:1500 in PBS/0.05% Tween-20, 0.1mL was added to each well, and plates were incubated at 37°C for two hours. Plates were washed (as above). Substrate solution was prepared by diluting p-nitrophenyl phosphate (Sigma) in 1M diethanolamine/0.5mM $MgCl_2$ to 1mg/mL. Substrate was added to the plate at 0.1mL per well and incubated at room temperature for one hour. The reaction was stopped with 50µL /well of 3N NaOH and plates were read at 405nm with 690nm reference.

B.) P4 Leader Sequence:

PCR Amplification and Cloning Strategy:

In order to optimize rLP2086 expression, the 2086 gene was cloned behind the P4 signal sequence of nontypable *Haemophilus influenzae* (Green *et al.*, 1991). Primers utilized for lipoprotein cloning are listed in Table IV and are identified by compound numbers: 5658, 5660, 6473, 6543 and 6385. ORF 2086 was amplified from *N. meningitidis* B strain 8529 using primers with the following compound numbers 5658 and 5660. ORF 2086 was amplified from *N. meningitidis* serogroup B strain CDC1573 using primers with the following compound numbers 6385 and 5660. ORF 2086 was amplified from *N. meningitidis* serogroup B strain 2996 using primers with the following compound numbers 6473 and 6543. The N-terminal (5') primers were designed to be homologous to the mature region of the 2086 gene (starting at the serine residue at amino acid position 3 just downstream of the cysteine). The restriction site BamHI (GGATTC) was incorporated into the 5' end of each N-terminal primer and resulted in the insertion of a glycine residue in the mature protein at amino acid position 2. The C-terminal (3') primers were designed to be homologous to the C-terminal end of the 2086 gene and included the Stop codon as well as an SphI site for cloning purposes. The amplified fragment from

each *N. meningitidis* B strain was cloned into an intermediate vector and screened by sequence analysis.

Plasmid DNA from correct clones was digested with BamHI and SphI restriction enzymes (New England Biolabs, (NEB)). A vector designated pLP339 (supplied by applicants' assignee) was chosen as the expression vector. This vector utilizes the pBAD18-Cm backbone (Beckwith *et al.*, 1995) and contains the P4 lipoprotein signal sequence and P4 gene of nontypable *Haemophilus influenzae* (Green *et al.*, 1991). The pLP339 vector was partially digested with the restriction enzyme BamHI and then subjected to SphI digestion. The amplified 2086 fragments (BamHI/SphI) were each ligated separately into the pLP339 vector (partial BamHI/SphI). This cloning strategy places the mature 2086 gene behind the P4 lipoprotein signal sequence. The BamHI site remains in the cloning junction between the P4 signal sequence and the 2086 gene (See the plasmid construct shown in FIG. 7). The following is an example of the sequence at the BamHI cloning junction:

[P4 signal sequence]– TGT GGA TCC –[remaining 2086 mature nucleic acid sequence]

[P4 signal sequence]– Cys Gly Ser –[remaining 2086 mature amino acid sequence]

Referring to FIG. 7, each amplified fragment was cloned into a modified pBAD18-Cm vector containing the P4 leader sequence. Fermentation was performed on recombinant *E. coli* BLR pPX7343 which expresses rP4LP2086 (recombinant P4 lipidated 2086) to try to increase the cell density by adding additional glucose. The fermentor was filled with 10L complete M9 Minimal medium, according to Sambrook, supplemented with 1% glucose.

The initial concentration of glucose in the fermentor was 45g/L. The fermentor was inoculated to initial OD of ~0.25. At ~OD 25, additional 20g/L glucose was added. The culture was induced with 1% arabinose at glucose depletion at OD 63.4. The fermentation continued until 3 hours after induction. Samples were saved at t=0, 1, 2, 3 post induction and protein quantified using BSA. At t=3,

protein yield is ~0.35 g/L, and 7% total cellular protein. A total of 895 grams of wet cell paste was harvested from ~10 L of culture.

Purification of the rP4LP2086 was performed using the same methods as described above in Example 2, section A.

Example 3

Development Genetics for Non-lipidated Mature 2086 Protein:

To further evaluate the immunogenicity of the 2086 protein, cloning and expression of the non-lipidated form of P2086 were performed.

PCR gene amplification of the ORF 2086:

Oligonucleotides used for PCR amplification of the non-lipidated 2086 gene are listed in the primer table, Table IV. The 2086 gene from strain 8529 can be amplified with primers identified by compound numbers 5135 and 6406 (SEQ ID NOS. 308 and 312, respectively), as indicated in the table. The 2086 gene from strain CDC1573 can be amplified with primers identified by compound numbers 5135 and 6474 (SEQ ID NOS. 308 and 316, respectively). The 2086 gene from strain 2996 can be amplified with primers identified by compound numbers 6406 and 6605 (SEQ ID NOS. 312 and 320, respectively).

Features of these primers include, a synthetic BglII restriction site in each primer, a synthetic NdeI restriction site in compound numbers 6406 and 6474 and termination codons in all three reading frames are present in compound numbers 5135 and 6605. Primer numbers 6406 and 6474 amplify the 2086 gene with an ATG (Met) fused to the second amino terminal codon (ACG) representing a single amino acid substitution (replaces TGC Cys) of the mature 2086 polypeptide.

The PCR cloning vector was TOPO-PCR2.1, Invitrogen, Valencia, CA.

The vector used to express non-lipidated 2086 protein was pET9a from Novagen, Madison, WI.

The *E.coli* cloning strain was Top10, Invitrogen, Carlsbad, CA.

The *E. coli* expression strain was BLR(DE3)pLysS, Novagen, Madison, WI.

The culture media for cloning purposes was Terrific Broth liquid or agar, according to Sambrook *et al.*, with 1% sterile glucose substituted for glycerol, and the appropriate antibiotic (ampicillin or kanamycin).

Plasmid purification was with Qiagen Spin Miniprep Kit (Valencia, CA).

92

Preparation of the production strain or cell line for Non-lipidated 2086 expression:

The 2086 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) [AmpliTaq and ABI 2400 thermal cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA] from chromosomal DNA derived from meningococcal strain 8529. The PCR amplification of the 2086 gene utilized two oligonucleotide primers in each reaction identified by compound numbers 6474 and 5135 (SEQ ID NOS. 316 and 308, respectively). The amplified 2086 PCR product was cloned directly into the TOPO-PCR2.1 cloning vector and selected on Terrific Broth agar supplemented with 100 μg/ml ampicillin and 20 μg/ml X-Gal. White colonies were selected and grown. Plasmid DNA was prepared using a Qiagen miniprep kit and the plasmids were screened for the PCR fragment insert. PCR insert plasmids were subjected to DNA sequencing (Big Dye chemistry on an ABI377 sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Plasmids exhibiting the correct DNA sequence were digested with BglII restriction enzyme and the BglII fragment was gel purified using a GeneClean II purification kit (Bio101, Carlsbad, CA). The purified BglII fragment was cloned into the BamHI site of the expression vector pET9a. The pET9a/2086 clones were selected on Terrific Broth plates supplemented with 30 μg/ml kanamycin. Kanamycin resistant clones were grown and miniprep plasmid DNA was prepared. The plasmids were screened for the appropriate orientation of the 2086 gene in the BamHI site. Correctly oriented plasmids represent a fusion of the T7-antigen to the amino terminus of 2086 gene (rP2086T7). These rP2086T7 gene fusions were transformed into BLR(DE3)pLysS, selected on Terrific Broth/Kan plates, grown in Terrific Broth and induced to express the rP2086T7 fusion protein with 1 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside). The rP2086T7 fusion protein expressed at high levels.

These fusion plasmids were then subjected to a NdeI restriction digest, which deletes the T7-antigen and links the mature 2086 gene directly to the ATG start provided by the vector. These NdeI deleted plasmids were transformed into Top10 cells and selected on Terrific Broth/Kan plates. Candidate clones were grown and miniprep plasmid DNA was prepared. The plasmid DNA was subjected to DNA sequencing to confirm the deletion and the integrity of the 2086 gene sequence. These plasmids are represented by the plasmid map designated pPX7328 (FIG. 6).

Plasmids representing the correct DNA sequence were transformed into BLR(DE3)pLysS, selected on Terrific Broth/Kan plates, grown in Terrific Broth and induced to express the 2086 protein with IPTG. The pET9a vector failed to express the mature 2086 protein, in strain BLR(DE3)pLysS, when the T7-Tag was removed.

Production of Non-lipidated 2086 protein:

Purified plasmid DNA was used to transform the expression strain BLR(DE3)pLysS. BLR(DE3)pLysS cells carrying the plasmids are resistant to kanamycin and can be induced to express high levels of PorA protein by the addition of 1 mM IPTG. The rP2086T7 fusion protein can be expressed as insoluble inclusion bodies in the *E.coli* cell line BLR(DE3)pLysS at ~40% of total protein. This purified fusion protein was used to immunize mice and generated significant levels of bactericidal antibodies against a heterologous meningococcal strain. (See Table V)

2086 Non-lipidated gene mutagenesis:

PCR primer mutagenesis was performed on the 5' end of the 2086 gene. Expression studies are under way to determine if the T7-Tag can be removed while exhibiting the high expression levels of mature rP2086T7.

Purification of non-lipidated rP2086T7:

E. coli BLR(DE3)pLysS cells expressing non-lipidated rP2086T7 were lysed by microfluidizer in 10mM Hepes-NaOH/5mM EDTA/1mM Pefabloc SC pH 7.4. The cell lysate was then centrifuged at 18,000xg for 30 minutes. The inclusion body pellet was washed three times with 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% TritonX-100 pH 8 followed by centrifugation each time at 24,000xg for 30 min. The inclusion body pellet was then washed twice with 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Zwittergent 3-14 pH 8 followed by centrifugation each time at 24,000xg for 15min. The inclusion body pellet was then solubilized with 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/4M Urea pH 8 for two hours followed by centrifugation to remove insoluble material. The supernatant (solubilized rP2086T7) was split into four equal samples. One sample was adjusted to 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/250mM NaCl/2M Urea pH8 (no detergent), one was adjusted to 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/250mM NaCl/2M Urea/1% hydrogenated Triton X-100 pH8 (TX-100), one was adjusted to 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/250mM NaCl/2M Urea/1% Zwittergent 3-12 pH8

(Z3-12), and one was adjusted to 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/250mM NaCl/2M Urea/1% Zwittergent 3-14 pH8 (Z3-14) using stock solutions. To remove the urea, samples were dialyzed to completion against the respective buffer containing no urea. The samples were then dialyzed to completion against the respective buffer containing no urea and 60mM NaCl to reduce the NaCl concentration. Insoluble material was removed by centrifugation at 2,000xg for 15 minutes, and the resulting supernatant (refolded rP2086T7) was used for further experiments. Homogeneity of rP2086T7 was found to be 91-95% as determined using Coomassie stained SDS-PAGE and laser densitometry.

Immunogenicity Procedure – As described in Example 2

This purified fusion protein was used to immunize mice and generated significant levels of bactericidal antibodies against a heterologous meningococcal strain. (See Table V below):

TABLE V: Bactericidal titers of mouse antibody raised to rP2086T7

MOUSE SERUM	DESCRIPTION	HETEROLOGOUS STRAIN/ H44/76
AF780 week 6	r2086T7 , 10ug	3200
Week 0 pool	Pre-immune serum	10
AE203 week 6	rLP2086, 10 ug (positive control)*	6400

(* positive control sera generated by immunization of mice with rLP2086)

Example 4

Development of Chimeric Clones of ORF 2086

The N-terminal region of the 2086 gene from strain CDC-1573 contains a repeated segment not present in the 2086 gene from strains 8529 and 2996 (see FIG. 8). It appears that this repeated segment is responsible for increased levels of recombinant 2086 protein expression from two *E.coli* based expression systems (pET and pBAD). The recombinant protein expression level from the CDC-1573 2086 gene was significantly better in the pET and pBAD expression systems as compared to the recombinant expression levels from the 2086 gene with strains 8529 and 2996 using the same systems. The N-terminal region of the 2086 gene from all three strains is relatively homologous, except for this repeated segment. Therefore,

it is reasonable to assume that by fusing the CDC-1573 N-terminus to the 2086 genes from strains 8529 and 2996, that the recombinant 2086 protein levels expressed from these genes will increase when using the pET and pBAD systems.

Materials and Methods:

Chromosomal DNA from strains 8529 and 2996 was purified and used as a template for PCR amplification of the chimeric 2086 gene. PCR primers with the compound numbers 6721 and 5135 (SEQ ID NOS. 321 and 308, respectively) were used to amplify the chimeric 2086 gene from strain 8529 and PCR primers with the compound numbers 6721 and 6605 (SEQ ID NOS. 321 and 320, respectively) were used to amplify the chimeric 2086 gene from strain 2996. The PCR products were cloned directly into the PCR2.1 TOPO vector from Invitrogen and then screened by DNA sequence analysis to identify an intact chimeric 2086 gene. That gene was then cleaved from the PCR2.1 vector with BglII and the BglII fragment was inserted into the BamHI site of the pET9a plasmid. Plasmid inserts were screened for the appropriate orientation and then subjected to a NdeI digestion. The linear NdeI fragments were self-ligated to achieve the deletion of a small NdeI fragment containing the T7-tag sequence contributed by the pET9a vector. This deletion directly links the T7 promoter to the 5' end of the chimeric 2086 gene. The NdeI deleted plasmid was transformed into *E.coli* strain BL21(DE3) and kanamycin resistant colonies were screened for chimeric 2086 protein expression with IPTG induction.

Initial studies indicate that the chimeric 2086 gene from strain 2996 expresses about twice as much recombinant protein as compared to the native 2996/2086 gene when expressed in the pET9a system. The pBAD system has not been tested yet.

Although only one experiment has been performed, the data indicate that there is an enhanced utility from the chimeric 2086 gene. The generation of CDC-1573 N-terminal fusions to the 2086 genes from strains 8529 and 2996 provides enhanced recombinant 2086 protein expression.

96

Example 5

2086 PCR Screening of *N. meningitidis* strains:

In order to determine the conservation of the 2086 gene among clinical isolates, PCR amplification was performed on 88 *N. meningitidis* strains.

Initial PCR identification of ORF 2086 utilized primers listed in Table IV (see Example 2 above) identified by compound numbers: 4623, 4624 and 4625 (SEQ ID NOS. 303, 304 and 305, respectively). These primers were designed based on Sanger's *N. meningitidis* serogroup A sequence. To facilitate screening a large number of strains, internal primers were designed for the 2086 gene. A total of 88 *N. meningitidis* strains were screened by PCR with the newly designed internal 2086 primers identified by compound numbers 5005 and 5007 (SEQ ID NOS. 306 and 307). With these primers the applicants were able to identify the 2086 gene from 63 of the 88 (~70%) *N. meningitidis* strains, (see Table VI-A).

Expanded regions surrounding the 2086 gene in Sanger's *N. meningitidis* serogroup A sequence and TIGR's *N. meningitidis* serogroup B sequence were examined and aligned. Primers were designed to correspond to regions upstream and downstream of the 2086 gene. The purpose was to utilize these primers to amplify greater than full length 2086 genes from a variety of *N. meningitidis* strains for sequence comparison. PCR amplification of one strain (6557), using Compound Nos. 6470 and 6472 (SEQ ID NOS: 313 and 314, respectively), resulted in a low yield of product. The strain 6557 amplified product was cloned and plasmid DNA was submitted for sequence analysis. Results indicated a new type of 2086 gene with greater sequence variability than had previously been seen. The 2086 gene from strain 6557 was ~75% identical at the amino acid level to the other strains sequenced. Interestingly, strain 6557 was one of the 30% of strains that had previously tested negative by 2086 PCR screening described above.

Internal primers specific to the C-terminal variable regions within strain 6557 were designed. These primers were used to screen for the more variable 2086 gene in the ~30% of strains that had previously tested negative by 2086 PCR screening. All available *N. meningitidis* strains (n = 88) were screened by PCR with these newly identified internal 2086 primers (identified by compound numbers 6495

and 6496; SEQ ID NOS. 159 and 160, respectively). Only the ~30% of *N. meningitidis* strains that had previously tested negative by PCR for 2086 were PCR positive in this screen. The set of genes amplified from the previously PCR negative (~30%) strains should represent a new type of 2086 gene or a second family of 2086 genes and herein are designated 2086 Subfamily A. The set of 2086 genes amplified from the ~70% of strains with the 8529 derived primers are herein designated Subfamily B.

Subfamily A of 2086 genes is exemplified by the odd numbered SEQ ID NOS:1-173 without limitation. Subfamily B of 2086 genes is exemplified, without limitation, by the odd numbered SEQ ID NOS: 175-251.

N. meningitidis strains used for PCR amplification studies were selected from the following tables, Table VI-A and Table VI-B. The strains listed in the tables are provided as examples of *N. meningitidis* strains, without limitation. The strains listed in Table VI-A are classified in 2086 protein Subfamily A and the strains listed in Table VI-B are classified in 2086 protein Subfamily B. The strains listed in each table are grouped by serosubtype. The strains are available from the following four sources as indicated in the table: MPHL-Manchester Public Health Laboratory, Manchester, UK; RIVM, Bilthoven, The Netherlands; University of Iowa, College of Medicine, Department of Microbiology, Iowa City, IA; and Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C.

TABLE VI-A

Strain	Serosubtype	Source
M97 251854	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250622	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250572	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250771	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250732	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250809	B:15, PI:7,16	MPHL
M97 252697	B:1, PI:6	MPHL
M97 252988	B:4, PI:6	MPHL
M97 252976	B:4, PI:6	MPHL
M97 252153	B:4, PI:6	MPHL
M97 253248	B:15,PI:7, NT	MPHL
CDC1610	P1:NT 4(15)	CDC
CDC1521	P1.6,3 2b(4)	CDC
CDC1034	P1.7 4(15)	CDC
L8	P1.7,1 15(4)	Walter Reed
CDC1492	P1.7,1 4(15)	CDC
870446	P1.12a,13	RIVM
CDC2369	P1.(9),14	CDC
6557	P1.(9),14	RIVM
2996	P1.5,2	RIVM
NmB	P1.5,2	UIOWA
L3	P1.5,2	Walter Reed
B16B6	P1.5,2	RIVM
CDC1135		CDC
L5	P1.NT	Walter Reed
L4	PI.21,16	Walter Reed

5

TABLE VI-B

Strain	Serosubtype	Source
M98 250670	B:1, PI:4	MPHL
M98 250024	B:1, PI:4	MPHL
M97 253524	B:1, PI:4	MPHL
M97 252060	B:1, PI:4	MPHL
M97 251870	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251836	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251830	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251905	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251898	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251885	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251876	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251994	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251985	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251957	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251926	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252045	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252038	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252026	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252010	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252098	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252083	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252078	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250735	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250797	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250768	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250716	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250699	B:4z,PI:10	MPHL
M98 250393	B:4z,PI:10	MPHL
M98 250173	B:4z,PI:10	MPHL
M97 253462	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250762	B:15, PI:7,16	MPHL
M98 250610	B:15, PI:7,16	MPHL
M98 250626	B:15, PI:7,16	MPHL
M97 250571	B:15, PI:16	MPHL
M97 252097	B:15, PI:16	MPHL
M97 253092	B:1, PI:6	MPHL
M97 252029	B:15,PI:7, NT	MPHL
M97 251875	B:15,PI:7, NT	MPHL

Strain	Serosubtype	Source
CDC1127	Pl.7,16 4(15)	CDC
CDC982	Pl.7,16 4(15)	CDC
CDC1359	Pl.7,16 4(15)	CDC
CDC798	Pl.7,16 15(4)	CDC
CDC1078	Pl.7,16 15(4)	CDC
CDC1614	Pl.7,16 15(4)	CDC
CDC1658	Pl.7,16 15(4)	CDC
H44/76	Pl.7,16 15(4)	RIVM
CDC1985	P1.7,13 4(15)	CDC
L6	P1.7,1 ?(4)	Walter Reed
CDC1573	P1.7,1 4(15)	CDC
L7	P1.7,(9),1	Walter Reed
CDC937	P1.7,3	CDC
8529	P1.7,3	RIVM
880049	P1.7b,4	RIVM
CDC2367	P1.15 4(15)	CDC
H355	P1.19,15	RIVM
CDC1343	P1.14 4(15)	CDC
M982	P1.22,9	RIVM
870227	P1.5c,10	RIVM
B40	P1.5c,10	RIVM
5315	P1.5c,10	RIVM
CDC983	P1.5,2	CDC
CDC852	P1.5,2	CDC
6940	P1.18,25 (6)	RIVM

Other strains are readily available as isolates from infected individuals.

Example 6

Reactivity of rLP2086 antisera against meningococcal strains:

The following table, Table VII, shows the cross-reactive and cross protection capacity of the rLP2086 as described above. As indicated in the table, the rLP2086 was processed and analyzed using a variety of techniques including whole cell ELISA (WCE) titers, bactericidal assay (BCA) and Infant Rat (IR) assays to determine the bacterial cell surface reactivity of a polyclonal antibody raised against the 2086 protein.

TABLE VII

Reactivity of rLP2086-8529 antisera against multiple meningococcal strains

Strain	Serosubtype	WCE	BC	IR
2086 Subfamily A				
870446	P1.12a,13	808,615	>800	
NmB	P1.5a,2c	47,954	<100	
6557	P1.22a,14a	169,479	<25	-
2086 Subfamily B				
880049	P1.7b,4	1,402,767	100	+
H44/76	P1.7,16	8,009,507	>6400	
H355	P1.19,15	10,258,475	3,200	+
6940	P1.18,25(6)	5,625,410	800	
870227	P1.5c,10	4,213,324	<25	+
252097	P1.7b,16	10,354,512	>800	
539/8529	P1.7b,3	11,635,737	3,200	
M982	P1.22,9	1,896,800	800	
CDC-1573	P1.7a,1	208,259	25	
CDC-937	P1.7b,(3)	9,151,863	>800	

+ greater than 10 fold reduction in bacteremia

- less than 10 fold reduction in bacteremia

Example 7

Various constructs for expressing ORF2086 protein were prepared. The following table, Table VIII, is an r2086 construct table which is provided for the purpose of showing examples and illustrating an implementation of the present invention, without limitation thereto.

TABLE VIII

r2086 Construct Summary

Construct	Promoter	Leader	Expression	Extraction	Vector	% total Protein
pPX7340	T7	native	Coomassie	sarcosyl soluble	pET27b	2.5% processed lipoprotein
pPX7341	T7	P4	Coomassie	sarcosyl soluble	pET27b	5% processed lipoprotein
pPX7343	Arabinose	P4	Coomassie	sarcosyl soluble	pBAD18 cm	7-10% processed lipoprotein
pPX7325	T7	T7-tag fusion/ mature	Coomassie	Inclusion bodies	pET9a	40-50% mature protein
pPX7328	T7	mature	Coomassie	soluble	pET9a	10% mature protein

Example 8

Further studies with LOS depleted outer membrane proteins identified additional strains producing outer membrane protein(s) other than PorA which were capable of eliciting bactericidal antibodies to strains expressing heterologous serosubtypes. The following describes further studies to identify additional proteins according to one embodiment of the present invention, and specifically outer membrane lipoproteins, which can reduce the number of proteins required in a meningococcal immunogenic composition. These further studies supplement the studies described in the previous examples.

Subcellular fractionation, differential detergent extraction, isoelectric focusing, and ion exchange chromatography were used in conjunction with immunization and bactericidal assays against multiple strains to identify small groups of proteins of interest. Direct sequencing of the main components indicated that the N-termini were blocked. Internal protein sequences were obtained by direct sequencing of polypeptides derived from chemical and proteolytic digests. The genomic sequence of a group A meningococcal strain was downloaded from the

Sanger Center and analyzed by our Bioinformatics group using existing and proprietary algorithms to create a searchable database. The peptide sequence data indicated that ORF2086 was of interest. Primers based on this orf were used to PCR the P2086 gene from strain 8529. Analysis of the gene sequence, the fact that the N-terminus was blocked, and its subcellular location indicated that P2086 is a lipidated outer membrane protein(LP2086). rLP2086-8529 and variants from other meningococcal strains were recombinantly expressed as lipoproteins in E.coli using the *H.influenzae* P4 signal sequence. These recombinant proteins were isolated from E.coli membranes by differential detergent extraction, purified using ion exchange chromatography, and used to immunize mice. Mouse anti-LP2086 sera were able to facilitate bactericidal activity against several different serosubtype strains of *N.meningitidis*. Further analysis of the P2086 genes from many *N. meningitidis* strains showed that these sequences fell into two groups designated Subfamily A and Subfamily B. (See FIG. 12) The antisera raised against the Subfamily B proteins were bactericidal against nine strains expressing Subfamily B proteins, and one strain expressing a Subfamily A protein. Subfamily A antisera were bactericidal against Subfamily A strains. A mixture of one rPorA and one rLP2086 elicited complementary antibodies extending vaccine coverage beyond that induced by either protein alone.

These observations lead to the following conclusions. rLP2086 antigens are capable of eliciting bactericidal antibodies against meningococcal strains expressing heterologous PorAs and heterologous P2086 proteins. The P2086 family of antigens may be a useful vaccine or immunogenic either alone or in combination with other neisserial antigens.

The following describes the foregoing study in detail. A complex mixture of soluble outer membrane proteins (sOMPs) was found to elicit PorA independent bactericidal antibody against strains expressing heterologous PorA proteins. A process of differential detergent extraction, isoelectric focusing and ion exchange chromatography followed by mouse immunization was used to follow the immunologically active components.

At each step, sera was assayed for surface reactivity and bactericidal activity against several strains containing serosubtype antigens that are representative of the worldwide epidemiology of meningococcal disease.

This process of separation and immunization was used to identify a novel cross-reactive immunogenic candidate for Group B *N. meningitidis*.

Generation of PorA deficient strains - The porA chromosomal locus was cloned into plasmid pPX7016 from strain 2996. Within the plasmid the porA promoter, the S/D box and the first 38 N-terminal codons have been deleted and replaced with a self contained KanR expressing cassette. The plasmids were linearized with restriction enzymes and naturally transformed into the serosubtype strains PI:5,2; PI:9; PI:7,16; PI:15; PI:4; PI:3 & PI:10. Kanamycin resistant transformants were selected and screened for the loss of PorA by serosubtype specific monoclonals in an ELISA.

Bactericidal Assay : See Mountzourous, K.T. and Howell, A.P. Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Flourescence-Based Serum Bactericidal Assay for Group B *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol. 2000;38:2878-2884.

Whole Cell Enzyme Linked Immonosorbant Assay (ELISA): *N. meningitidis* whole cell suspensions were diluted to an optical density of 0.1 at 620nm in sterile 0.01M phosphate, 0.137M NaCl, 0.002M KCl (PBS). From this suspension, 0.1mL were added to each well of Nunc Bac T 96 well plates (Cat# 2-69620). Cells were dried on the plates at 37°C overnight, then were covered, inverted and stored at 4°C. Plates were washed three times with wash buffer (0.01M Tris-HCl,0.139M NaCl/KCl,0.1% Brij-35, pH 7.0-7.4). Dilutions of antisera were prepared in PBS, 0.05% Tween-20/Azide and 0.1mL was transferred to the coated plates and incubated for two hours at 37°C. Plates were washed three times in wash buffer. Goat-anti-mouse IgG AP (Southern Biotech) was diluted at 1:1500 in PBS/0.05% Tween-20, 0.1mL was added to each well, and plates were incubated at 37°C for two hours. Plates were washed (as above). Substrate solution was prepared by diluting p-nitrophenyl phosphate (Sigma) in diethanolamine at 1mg/ml . Substrate was added to the plate at 0.1mL per well and incubated at room

105

temperature for one hour. The reaction was stopped with 50ul/well of 3N NaOH and plates were read at 405nm with 690nm reference.

Recombinant PorA Induction: The BLR(DE3)/pET9a strains were grown overnight at 37°C in HySoy Broth (Sheffield Products) supplemented with Kan-30 and 2% glucose. In the morning the O/N cultures were diluted 1/20 in HySoy Broth Kan-30 and 1% glycerol and grown at 37°C for 1 hour. These cultures were induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1mM. The cultures were grown for an additional 2-3 hours and then harvested.

Recombinant PorA Purification: The rPorA was solubilized from *E. coli* inclusion bodies with 8M Urea, and refolded by dialysis against buffer containing no urea. The refolded rPorA was then concentrated by diafiltration and buffer exchanged by G25 column into NaPO4 pH6. The dialyzed rPorA was then run on a cation exchange column (S Fractogel) and eluted with 1M NaCl.

The sOMPs from strain 8529 (P1.7-2,3) elicit PorA independent bactericidal activity in mice against strains expressing heterologous serosubtypes. The following table, Table IX, shows the bactericidal activity in the studied strains.

TABLE IX

Test Strain	Serosubtype	BC_{50}Titer[1]
539	P1.7-2,3	1280
539 PorA-	NST[2]	1080
H44/76	P1.7,16	3285
H44/76 PorA-	NST	2620
H355	P1.19,15	>1350
H355 PorA-	NST	>1350
880049	P1.7-2,4	290
880049 PorA-	NST	85
M982	P1.22,9	85
M982 PorA-	NST	<50

Preparation of sOMPs: *N. meningitidis* membranes were extracted with TX-100, Zwittergent 3-14, and Zwittergent 3-14+0.5M NaCl. The sOMPs referred to above were solubilized in the Zwittergent 3-14/0.5M NaCl extract. The extraction is performed using techniques well known to persons skilled in the art, for example, see U.S. Patent No. 6,355,253 which is hereby incorporated by reference.

Immunogencity: Female Swiss-Webster mice were immunized with 25ug total protein adjuvanted with 20ug QS-21 at week 0 and 4. An exsanguination bleed and data analysis were done at week 6.

1 Bactericidal (BC_{50}) titers represented as the reciprocal of the dilution of anti-sera which reduces viable cell count by 50%. Week 0 normal mouse sera had BC_{50} titers of <25

2 NST = Non Serosubtypable

The following table, Table X, shows the purification and characterization summary for recombinant lipidated P2086 (rLP2086) for both Subfamily A and Subfamily B.

Subfamily A rLP2086 Purification

TABLE X

rLP2086 Variant	A.A. Homology (%)[1]	Theoretical pI	Purity (%)[2]
870446	75	6.1	80
2996	71	5.9	95
M97 252988	71	6.3	96
C11	68	6.4	82
M98 250771	62	6.1	83

Subfamily B rLP2086 Purification

TABLE XI

rLP2086 Variant	A.A. Homology (%)[1]	Theoretical pI	Purity (%)[2]
8529	100	7.5	96
M982	94	6.3	96
88049	92	6.2	90
CDC1573	87	5.6	93

Purification Method: All variants were solubilized from *E. coli* membranes with TX-100 (exception rLP2086-8529 which was solubilized with Sarcosyl or Urea). Further purification was achieved with a combination of anion exchange (TMAE), size exclusion and/or cation exchange (S Fractogel) chromatography in a Tris-HCl or NaPO4 buffer.

1 Amino acid homology as compared to P2086 from strain 8529

2 Purity as determined by SDS-PAGE and laser densitometry of colloidal Coomassie stained band (Simply Blue stain)

Immunogenicity of a Subfamily B member, rLP2086-8529, tested against homologous and heterologous strains

Table XII below shows immunogenicity of a Subfamily B member, rLP2086-8529, tested against homologous and heterologous strains

TABLE XII

Target Strain	P2086 Subfamily	Target Strain Serosubtype	A.A. Homology[a]	Whole Cell ELISA[b] Titer	BC_{50} Titer[c]
539	B	P1.7-2,3	100	>1,458,000	3,200
H44/76	B	P1.7,16	100	>1,458,000	3,200
H355	B	P1.19,15	100	>1,458,000	3,200
CDC937	B	P1.7-2,3-4	100	>1,458,000	>800
M97 252097	B	P1.7-2,16	100	>1,458,000	>800
870227	B	P1.5-2,10	100	>1,458,000	<25
6940	B	P1.18,25,6	97	900,162	>800
M982	B	P1.22,9	94	435,909	200
880049	B	P1.7-2,4	92	349,912	400
CDC1573	B	P1.7-1,1	87	102,508	25
870446	A	P1.12-1,13	71	389,829	800
M98 250771	A	P1.22,14	62	139,397	<25
NmB	A	P1.5-1,2-2	71	<2,000	<25

Vaccination Procedure: 6-8 week old female Swiss-Webster mice were immunized with 10ug rLP2086-8529+20ug QS-21 at week 0 and week 4. Data analysis was performed on the week 6 exsanguination bleed.

aAmino acid homology of P2086 as compared to rLP2086-8529

b Endpoint titers expressed as the reciprocal of the dilution at absorbance = 0.1

c BC50 titers represented as the reciprocal of the dilution of anti-sera which reduces viable cell count by 50%. Week 0 normal mouse sera had BC50 titers of <10

Table XIII shows immunogenicity of a Subfamily B member, rLP2086-2996, tested against homologous and heterologous strains.

TABLE XIII

Target Strain	P2086 Subfamily	Target Strain Serosubtype	A.A. Homology[a]	Whole Cell ELISA[b] Titer	BC_{50} Titer[c]
NmB	A	P1.5-1,2-2	99.6	8,979	<25
870446	A	P1.12-1,13	99	<1,458,000	>800
M97 252697	A	P1.18,25,6	98	320,732	>800
6557	A	P1.22-1,14-1	98	17,319	<25
M98 250732	A	P1.22,14-1	89	241,510	>800
M98 250771	A	P1.22,14	89	447,867	800
H44/76	B	P1.7,16	72	56,386	<25

Vaccination Procedure: 6-8 week old female Swiss-Webster mice were immunized with 10ug rLP2086-2996+20ug QS-21 at week 0 and week 4. Data analysis was performed on the week 6 exsanguination bleed.

aAmino acid homology of P2086 as compared to rLP2086-2996

b Endpoint titers expressed as the reciprocal of the dilution at absorbance = 0.1

c Bactericidal (BC50) titers represented as the reciprocal of the dilution of anti-sera which reduces viable cell count by 50%. Week 0 normal mouse sera had BC50 titers of <10.

Table XIV below shows that antisera to rLP2086 and rPorA are complimentary when mixed and assayed for bactericidal activity.

TABLE XIV

Antisera	H44/76 (P1.7,16)	NMB (P1.5-1,2-2)	880049 (P1.7-2,4)	H355 (P1.19,15)	870227 (P1.5-2,10)	6557 (P1.22-1,14-1)
Anti-rLP2086 + three rPorA antisera	>3,200	>800	200	>800	200	200
Controls						
anti-rLP2086	6,400	<25	100	3,200	<25	<25
Corresponding monovalent rPorA antisera	-	1,600	-	-	200	400

Vaccination Procedure: 6-8 week old female Swiss-Webster mice were immunized with either 10ug rLP2086-8529/20ug QS-21, or 15ug rPorA/100ug

MPL at week 0 and week 4. Data analysis was performed on the week 6 exsanguination bleed.

a Bactericidal (BC50) titers represented as the reciprocal of the dilution of anti-sera which reduces viable cell count by 50%. Week 0 normal mouse sera had BC50 titers of <10.

The following table, Table XV, shows that mixtures of rLP2086 Subfamilies and two rPorAs elicit bactericidal antibody in mice.

TABLE XV

	H44/76	6940	880049	M982	M98 250771	M98 250732	M97 252697	870446	NmB	6557
	SfB[b]	SfB	SfB	SfB	SfA[b]	SfA	SfA	SfA	SfA	SfA
	P1.7,16	P1.18 25,6	P1.7-2,4	P1.22,9	P1.22,14	P1.22,14-1	P1.18,25,6	P1.12-1,13	P1.5-1,2-2	P1.22-1,14-1
Antigen										
rLP2086-8529 + rLP2086-2996	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	-	<25
rLP2086-8529 + rLP2086-2996 + rP1.5-1,2-2 + rP1.22-1,14-1	>800	800	100	200	400	400	>800	>800	>800	200
Monovalent Controls[c]	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	>800	800

Vaccination Procedure: 6-8 week old female Swiss-Webster mice were immunized with 10ug of each protein + 20ug QS-21 at week 0 and week 4. Data analysis was performed on the week 6 exsanguination bleed.

a Bactericidal (BC50) titers represented as the reciprocal of the dilution of anti-sera which reduces viable cell count by 50%. Week 0 normal mouse sera had BC50 titers of <10.

bSfA – Subfamily A, SfB – Subfamily B

cRelevant monovalent control: rLP2086-8529, rLP2086-2996, rP1.5-1,2-2 or rP1.22-1,14-1 antisera

The following summarizes the results of the above described studies. Anti-rLP2086 antisera is bactericidal against 13/16 test strains. Eleven strains expressing

different serosubtypes are killed by anti-P2086 sera. Bactericidal activity of anti-rLP2086 sera is complimentary to anti-rPorA sera. Mixtures of P2086 and PorA elicit complimentary bactericidal antibodies in mice. Differential detergent extraction, purification and immunization in conjunction with a functional antibody assay against many strains can be used to identify new vaccine candidates. P2086 has been identified as a vaccine candidate which elicits bactericidal antibody against strains heterologous in both P2086 and rPorA. Thus, the 2086 family of proteins may be a useful vaccine either alone or in combination with other neisserial antigens.

Example 9

In accordance with the previous examples, additional meningococcal strains, of varying serogroups, were screened by PCR for the presence of the ORF 2086 gene. Ultimately, one hundred meningococcal strains were screened. The following describes the study and its overall results. These results supplement the data from the previous examples.

Two sets of internal PCR primers specific to the C-terminal variable regions were utilized to discriminate between Subfamily A and B gene sequences. The presence of a PCR amplified product of approximately 350 bp indicated that the 2086 gene sequence was present on the chromosome. All strains yielded a single PCR product of the expected size. The nucleotide sequences of fifty-five full-length ORF 2086 genes were determined, aligned (DNAStar MegAlign) and used to generate a phylogenetic tree. (See FIG. 12).

Nine of these 2086 genes were recombinantly expressed as a rLP2086 lipoprotein in a pBAD arabinose inducible promoter system and three of these genes were recombinantly expressed as a rP2086 non-lipidated protein in an IPTG inducible pET system. These recombinant proteins were expressed in E.coli B. The purified recombinant protein was used to immunize mice and the mouse antisera was assayed for its serum IgG titers and its bactericidal activity against a variety of heterologous meningococcal strains.

ORF 2086 was amplified by PCR from one of the following, whole meningococcal cells, purified chromosomal DNA or plasmid DNA templates.

Nine ORF 2086 genes were cloned into the vector pLP339, which fuses the *Haemophilus* P4 leader sequence to the 5' end of the ORF 2086 genes. E.coli strain BLR was used as the host strain for recombinant expression of the lipidated form of rP2086 from

the pBAD/ORF 2086 clones. (See FIG. 10A) The pBAD arabinose inducible promoter drives the expression the P4 signal/ORF 2086 fusion protein to express a lipidated form of rP2086. Three P2086 genes, lacking a signal sequence, were cloned into a pET9a vector behind the highly active T7 phage promoter. E.coli strain BL21(DE3) was used as the host strain for recombinant expression of a non-lipidated form of ORF 2086 from the pET9a/ORF 2086 clones. (See FIG. 10B) The DE3 lysogen in E.coli strain BL21 can be induced to express the T7 RNA polymerase under the control of the lacUV5 promoter by addition of IPTG. See, WCE; FEMS Micro. Lett., 48 (1987) 367-371 and BCA; J. Clin. Microbiol., 38 (2000) 2878-2884.

The gene, ORF2086, was cloned and sequenced from fifty-five different *N. meningitidis* strains. The nucleotide sequences were aligned (DNAStar MegAlign) and used to generate a phylogenetic tree. (See FIG. 12). This tree reveals two distinct subfamilies of the ORF 2086 gene nucleotide sequence. The two subfamilies of genes are similar at their 5' ends, but contain considerable variation near their 3' ends. Although there appears to be significant variability, certain key regions of the gene are highly homologous amongst the different strains. These conserved regions may provide functional continuity for the protein and may be indicative of cross-protective epitopes to be exploited as vaccine targets.

The 2086 gene was cloned from several serogroup B meningococcal strains and expressed with and without the lipidation signal sequence. Referring to FIGS. 11A and 11B, gel photographs show the whole cell lysates of E.coli B expressing the r2086 protein. The non-lipidated form fused to the T7-Tag expressed at the highest level. The T7-Tag sequence may provide stability to the mRNA and significantly enhances the level of polypeptide translated. This fusion protein appears to deposit in inclusion bodies and can be purified and refolded readily with known protocols. The lipidated and non-lipidated forms of P2086 are expressed at approximately 5 to 8% of total cellular protein, with the exception of the T7-Tag fusions, which express rP2086 as approximately 50% of total protein. The non-lipidated form of the protein appears to be soluble and localized in the cytoplasm. The lipidated form of the protein appears to be associated with the membrane fractions and is solubilized with detergent.

The recombinant lipidated 2086 protein from *N. meningitidis* B strain 8529 consistently elicits greater serum IgG titers than the non-lipidated form (see Table XVI below), which correlates well with the enhanced level of bactericidal activity against both homologous and heterologous meningococcal strains (see Table XVII below). The protein in its native lipidated form may have superior tertiary structure for antigen presentation and/or the attached lipid may act as an adjuvant stimulating a greater immunogenic response.

TABLE XVI
Immune Response Elicited at Week 6 by WCE using
8529 rP2086 (non-lipidated) vs. 8529 rLP2086 (lipidated)

Mouse Sera		Meningococcal Strains				
Antigen (10 ug)	Adjuvant (20 ug)	H44/76	H355	870227	880049	870446
rP2088	QS-21	273,238	212,947	102,694	69,124	21,466
rLP2086	QS-21	5,384,306	4,819,061	2,930,946	1,307,091	886,056

TABLE XVII
8529 rP2086 Elicits Weaker Bactericidal Activity than 8529 rLP2086

Mouse Sera		Meningococcal Strains			
Antigen (10 ug)	Adjuvant (20 ug)	H44/76	H355	880049	NMB
rP2086	QS-21	200	100	<25	<25
rLP2086	QS-21	6,400	3,200	100	<25
Pre-Immune	-	<10	<10	<10	<10
Positive Control	-	1,600	100	200	1,600

The following is a summary of the results of the study. All *N. meningitidis* B strains tested appear to have one 2086-like gene. At least two families of the 2086 gene are represented: Subfamily A - about 30% of strains and Subfamily B - about 70% of strains. The 2086 gene has been cloned and sequenced from 55 *N. meningitidis* strains. Sequences within Subfamily A are ~86-100% identical at the DNA level. Sequence within Subfamily B are ~89.5-100% identical at the DNA level. Sequences within Subfamily A vs. Subfamily B ~60.9%-74% identical at the DNA level. 2086 homologs have been identified by PCR screening in the following:

N. meningitidis A, B, C, W135, Y

N. lactamica

N. gonorrhoeae FA1090

Several ORF 2086 genes have been cloned and recombinantly expressed

Lipidated versions of P2086 were expressed from nine meningococcal strains.

These recombinant proteins have been purified and used to vaccinate mice.

The resulting antisera is bactericidal.

Non-lipidated versions of P2086 were expressed from three of the above nine strains.

rLP2086 consistently elicits a greater immune response than rP2086.

rLP2086 also exhibits enhanced bactericidal activity against both homologous and heterologous meningococcal strains.

Example 10

The following tables, Tables XVIII and XIX, show the characterization of variants of members of the two subfamilies.

TABLE XVIII
Subfamily A rLP2086 Variants - Characterization

	rLP2086-252988	rLP2086-250771	rLP2086-870446	rLP2086-2996	rLP2086-C11
Growth Media	HySoy	HySoy	HySoy	HySoy	HySoy
Solubility	rTX-100 ⇒ Z3-12	TX-100	TX-100	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12
Purification Steps	TMAE S Fractogel SEC	HQ Poros SEC	HQ Poros SEC	TMAE SEC	TMAE S Fractogel
Purity (%)	96	83	80	95	82

		rLP2086-252988	rLP2086-250771	rLP2086-870446	rLP2086-2996	rLP2086-C11
Yield (mg/g cell pellet)		0.2	0.7	0.8	0.5 (fermentor)	0.1
Size	SEC (Z3-12)	134,000	155,000	132,000	163,000	126,000
	MS	27,897 (712 lipid)	-	-	27,878 (750 lipid)	28,139 (682 lipid)
Thermal Denaturation Transition Midpoint (T_M) °C		66 °C	-	.NT	65 °C	63 °C
Protein Available (mg)		2.7mg	1mg (Z3-12)	5.0mg	44mg	1.1mg
8529 Sequence Homology (%)		71	62	71	72	68

TABLE XIX
Subfamily B rLP2086 Variants - Characterization

		rLP2086-8529	rLP2086-M982	rLP2086-880049	rLP2086-CDC1573
Growth Media		Apollon (Sanford)	Apollon	HySoy	HySoy
Solubility		4M Urea ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100
Purification Steps		TMAE S Fractogel	TMAE S Fractogel	TMAE S Fractogel	TMAE SEC
Purity (%)		96	96	90	93
Yield (mg/g cell pellet)		0.2 (fermentor)	1.6 (fermentor)	0.4	1.0
Size	SEC (Z3-12)	95,000	110,000 150,000	100,000	120,000
	MS	27,785 (822 lipid)	27,719 (711 lipid)	28,044 (819 lipid)	28,385 (823 lipid)

	rLP2086-8529	rLP2086-M982	rLP2086-880049	rLP2086-CDC1573
Thermal Denaturation Transition Midpoint (T_M) °C	70 °C	75 °C	62 °C	NT
Protein Available (mg)	Urea – 34mg Sarc – 36mg	Pool 1 – 47mg Pool 2 – 17mg	3.6mg	4.9mg
8529 Sequence Homology (%)	100	94	92	87

Table XX below provides the results of fluorescent serum bactericidal assays for the 2086 Subfamily A.

TABLE XX

Description	250771	870446	6557	NMB	M98 250732	M97 252697
rLP2086-252988, 10μg	>800 (99%)*	>800 (99%)*	<25	-	>800 (99%)*	>800 (93%)*
rLP2086-C11, 10μg	200	>880 (91%)*	<25	-	200	400
rLP2086-250771, 10μg	>800 (92%)*	>800 (99%)*	<25	-	>800 (96%)*	>800 (84%)*
rLP2086-870446, 10μg	400	>800 (99%)*	<25	-	400	400
rLP2086-2996, 10μg	800	>800 (99%)*	<25	-	>800 (93%)*	>800 (72%)*
rLP2086-8529 + rLP2086-2996, 10μg	800	>800 (99%)*	<25	-	>800 (80%)*	>800 (72%)*
rLP2086-8529 + rP1.22a,14a + rP1.5a,2c, 10μg	-	800	200	>800 (98%)*	-	-
rLP2086-8529 + rLP2086-2996 + rP1.22a,14a + rP1.5a,2c, 10μg	400	>800 (99%)*	200	>800 (99%)*	400	>800 (88%)*
NMB/rLP2086-8529 vesicles, 20μg	-	100	-	400	-	-
rP1.22a,14a, 10μg	25	-	800	-	100	-
rP1.5a,2c, 10μg	-	-	-	>800 (99%)*	-	-

Description	250771	870446	6557	NMB	M98 250732	M97 252697
rLP2086-8529, 10μg	-	800	-	-	-	-
rP1.22a,14a, 25μg	200	-	-	-	800	-
rP1.18,25.6, 5μg	-	-	-	-	-	
nP1.22,9 (M982), 25μg	-	-	100	-	-	-
pre-immune mouse serum (negative control)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	800	400	800	1600	**	**

Notes:
* Percentage indicates the % BC activity at the 1:800 dilution.
** Positive control not available.
– serum not tested

Example 11

The following further demonstrates that P2086 is expressed in neisserial strains and provides additional specific examples of P2086 expression in several strains.

Cell lysates were prepared with cells from plate cultures resuspended in SDS sample buffer and heated at 98°C for four minutes. Samples were loaded at ~30-50ug total protein per well on 10-20% pre-cast gels (ICN) and run at 175V. The gels were transferred to a nitrocellulose membrane, which was then blocked for 30min. with 5% powdered milk in Tris-buffered saline (Blotto). The primary antibody used was a pool of polyclonal antisera raised against individual rLP2086 variants in mice.

Referring to FIGS. 17 and 18, a Western Blot shows the reactivity of rLP2086 mouse antisera to P2086 Subfamily A and B whole cell lysates. For the Subfamily A cell lysate blot, the antisera used were raised against rLP2086-2996, -870446 and –250771 with rLP2086-250771 diluted at 1/500 in Blotto and the others diluted at 1/1000 in Blotto. For the Subfamily B cell lysate blot, the antisera used were raised against rLP2086-8529 (diluted 1/1000 in Blotto), -CDC1573. –M982 and –880049 (these three diluted 1/500 in Blotto). The primary antisera and blot were incubated at 4°C overnight. The blot was washed, a goat-anti-mouseAP secondary was added at 1/500 in Blotto, and the blot was incubated for 30min. at room temperature. After washing, the blot was developed using the BCIP/NBT Membrane Phosphatase Substrate System (KPL).

BIBLIOGRAPHY

References referred to herein above are noted below and are incorporated herein by reference in their entirety:

1. 1997. Case definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance. CDC.

2. 1995 Sambrook, J. and D. W. Russell. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

3. 1994. Griffin, A. M. and Griffin, H. G., ed., Computer Analysis of Sequence Data, Part I. Humana Press, New Jersey.

4. 1993. Smith, D. W.. ed., Biocomputing: Informatics and Genome Projects. Academic Press, New York

5. 1991. Gribskov, M. and Devereux, J., ed. Sequence Analysis Primer. Stockton Press, New York.

6. 1988. Lesk, A. M., ed. Computational Molecular Biology. Oxford University Press, New York.

7. Abdillahi, H., and J. T. Poolman. 1988. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. *Microbial Pathogenesis* 4(1):27-32.

8. Achtman, M. 1995. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. *Trends in Microbiology* 3(5):186-92.

9. Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* [published erratum appears in Nature 1999 Feb 25;397(6721):719]. *Nature*. 397:176-80.

10. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25:3389-402.

11. Anderson, T. F. 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans N Y Acad Sci. 13:130-134.

12. Ambrosch, F., G. Wiedermann, P. Crooy, and A. M. George. 1983. Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 61(2):317-23.

13. Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res. 27:573-80.

14. Carillo, H., D. Lipman, and J. Siam. 1988. *Applied Math* 48:1073.

15. Chen, C. C., and P. P. Cleary. 1989. Cloning and expression of the streptococcal C5a peptidase gene in *Escherichia coli*: linkage to the type 12 M protein gene. *Infect. Immun.* 57:1740-1745.

16. Chmouryguina, I., A. Suvorov, P. Ferrieri, and P. P. Cleary. 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect. Immun.* 64:2387-2390.

17. Cockerill, F. R., 3rd, R. L. Thompson, J. M. Musser, P. M. Schlievert, J. Talbot, K. E. Holley, W. S. Harmsen, D. M. Ilstrup, P. C. Kohner, M. H. Kim, B. Frankfort, J. M. Manahan, J. M. Steckelberg, F. Roberson, and W. R. Wilson. 1998. Molecular, serological, and clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease. Southeastern Minnesota Streptococcal Working Group. *Clin Infect Dis.* 26:1448-58.

18. Courtney, H. S., Y. Li, J. B. Dale, and D. L. Hasty. 1994. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun.* 62:3937-46.

19. Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, and A. Elofsson. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Engineering.* 10:673-6.

20. Cunningham, M. W., and A. Quinn. 1997. Immunological crossreactivity between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Adv Exp Med Biol.* 418:887-92.

21. Dale, J. B., R. W. Baird, H. S. Courtney, D. L. Hasty, and M. S. Bronze. 1994. Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid. *J Infect Dis.* 169:319-23.

22. Dale, J. B., M. Simmons, E. C. Chiang, and E. Y. Chiang. 1996. Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine. *Vaccine.* 14:944-8.

23. Dale, J. B., R. G. Washburn, M. B. Marques, and M. R. Wessels. 1996. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun.* 64:1495-501.

24. Eddy, S. R. 1996. Hidden Markov models. *Cur Opin Struct Bio.* 6:361-5.

25. Ellen, R. P., and R. J. Gibbons. 1972. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun.* 5:826-830.

26. Eng, J. K., A. L. McCormack, and J. R. Yates, 3rd. 1994. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. *Am Soc Mass Spectrometry.* 5:976-89.

27. Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol.* 4:1603-5.

28. Fogg, G. C., and M. G. Caparon. 1997. Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rofA*. *J Bacteriol.* 179:6172-80.

29. Foster, T. J., and M. Hook. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:484-8.

30. Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J.

31. Gocayne, J. C. Venter, and *et al.* 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi* [see comments]. *Nature.* 390:580-6.

32. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1307-26.

33. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1327-48.

34. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1367-84.

35. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1385-95.

36. Green, B.A., Farley, J.E., Quinn-Dey, T., Deich, R.A., and Zlotnick, G.W.. 1991. The e (P4) Outer Membrane Protein of *Haemophilus influenzae*: Biologic Activity of Anti-e Serum and Cloning and Sequencing of the Structural Gene. *Infect. Immun.* 59: 3191-3198.

37. Guzman, L-M, Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J. 1995. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter. *J. Bacteriology* 177:4121-4130.

38. Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* 23:1089-97.

39. Hanski, E., and M. Caparon. 1992. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesion of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes. Proc Natl Acad Sci., USA.* 89:6172-76.

40. Hanski, E., P. A. Horwitz, and M. G. Caparon. 1992. Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in

heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 60:5119-5125.

41. Hernandez-Sanchez, J., J. G. Valadez, J. V. Herrera, C. Ontiveros, and G. Guarneros. 1998. lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA. *EMBO Journal.* 17:3758-65.

42. Huang, T. T., H. Malke, and J. J. Ferretti. 1989. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis. *Mol Microbiol.* 3:197-205.

43. Hynes, W. L., A. R. Dixon, S. L. Walton, and L. J. Aridgides. 2000. The extracellular hyaluronidase gene (*hylA*) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* 184:109-12.

44. Hynes, W. L., L. Hancock, and J. J. Ferretti. 1995. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect Immun.* 63:3015-20.

45. Isberg, R. R., and G. Tran Van Nhieu. 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbio.* 2:10-4.

46. Jones, K. F., and V. A. Fischetti. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci. *J Exp Med.* 167:1114-23.

47. Kihlberg, B. M., M. Collin, A. Olsen, and L. Bjorck. 1999. Protein H, an antiphagocytic surface protein in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 67:1708-14.

48. Koebnik, R. 1995. Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins [letter; comment]. *Molecular Microbiology.* 16:1269-70.

49. Kuipers, O. P., H. J. Boot, and W. M. de Vos. 1991. Improved site-directed mutagenesis method using PCR. *Nucleic Acids Res.* 19:4558.

50. Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157:105-132.

51. Landt, O., H. P. Grunert, and U. Hahn. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* 96:125-128.

52. Loessner, M. J., S. Gaeng, and S. Scherer. 1999. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. *J Bacteriol.* 181:4452-60.

53. Lukashin, A. V., and M. Borodovsky. 1998. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res.* 26:1107-15.

54. Lukomski, S., C. A. Montgomery, J. Rurangirwa, R. S. Geske, J. P. Barrish, G. J. Adams, and J. M. Musser. 1999. Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infect Immun.* 67:1779-88.

55. Madore, D. V. 1998. Characterization of immune response as an indicator of *Haemophilus influenzae* type b vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J.* 17:S207-10.

56. Matsuka, Y. V., S. Pillai, S. Gubba, J. M. Musser, and S. B. Olmsted. 1999. Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity. *Infect Immun.* 67:4326-33.

57. Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That, and O. Schneewind. 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science.* 285:760-3.

58. McAtee, C. P., K. E. Fry, and D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of Helicobacter pylori by "proteome" technologies. *Helicobacter.* 3:163-9.

59. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. Chow, and D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5:537-42.

60. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. P. Chow, and D. E. Berg. 1998. Characterization of a *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 714:325-33.

61. Mejlhede, N., J. F. Atkins, and J. Neuhard. 1999. Ribosomal -1 frameshifting during decoding of *Bacillus subtilis* cdd occurs at the sequence CGA AAG. *J. Bacteriol.* 181:2930-7.

62. Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, and G. S. Chhatwal. 1997. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun.* 65:1357-63.

63. Mountzouros, K. T., and A. P. Howell. 2000. Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 38(8):2878-2884.

64. Nakai, K., and M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins.* 11:95-110.

65. Navarre, W. W., and O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:174-229.

66. Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering.* 10:1-6.

67. Nizet, V., B. Beall, D. J. Bast, V. Datta, L. Kilburn, D. E. Low, and J. C. De Azavedo. 2000. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infect Immun.* 68:4245-54.

68. Nordstrand, A., W. M. McShan, J. J. Ferretti, S. E. Holm, and M. Norgren. 2000. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect Immun.* 68:1019-25.

69. Olmsted, S. B., S. L. Erlandsen, G. M. Dunny, and C. L. Wells. 1993. High-resolution visualization by field emission scanning electron microscopy of

Enterococcus faecalis surface proteins encoded by the pheromone-inducible conjugative plasmid pCF10. *J Bacteriol.* 175:6229-37.

70. Park, J., and S. A. Teichmann. 1998. DIVCLUS: an automatic method in the GRANFAMMER package that finds homologous domains in single- and multi-domain proteins. *Bioinformatics.* 14:144-50.

71. Parkhill, J., M. Achtman, K. D. James, S. D. Bentley, C. Churcher, S. R. Klee, G. Morelli, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. M. Davies, P. Davis, K. Devlin, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, K. Mungall, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Spratt, and B. G. Barrell. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491 [see comments]. *Nature.* 404:502-6.

72. Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. 1987. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem.* 262:17294-8.

73. Pizza, M., V. Scarlato, V. Masignani, M. M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G. T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, C. L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broeker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D. W. Hood, A. C. Jeffries, N. J. Saunders, D. M. Granoff, J. C. Venter, E. R. Moxon, G. Grandi, and R. Rappuoli. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287(5459):1816-20.

74. Podbielski, A., A. Flosdorff, and J. Weber-Heynemann. 1995. The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes. *Infect Immun.* 63:9-20.

75. Poolman, J. T. 1996. Bacterial outer membrane protein vaccines. The meningococcal example. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 397:73-7.

76. Proft, T., S. Louise Moffatt, C. J. Berkahn, and J. D. Fraser. 1999. Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med.* 189:89-102.

77. Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 57:50-108.

78. Quinn, A., K. Ward, V. A. Fischetti, M. Hemric, and M. W. Cunningham. 1998. Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Infect Immun.* 66:4418-24.

79. Reda, K. B., V. Kapur, D. Goela, J. G. Lamphear, J. M. Musser, and R. R. Rich. 1996. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of ssa within *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 64:1161-5.

80. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*, Third ed, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

81. Salzberg, S. L., A. L. Delcher, S. Kasif, and O. White. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. Nucleic Acids Res. 26:544-8.

82. Saukkonen, K., H. Abdillahi, J. T. Poolman, and M. Leinonen. 1987. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microbial Pathogenesis* 3(4):261-7.

83. Sedegah *et al.* 1994. *Immunology.* 91, 9866-9870.

84. Sonnenberg, M. G., and J. T. Belisle. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun.* 65:4515-24.

85. Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy, and R. Durbin. 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins.* 28:405-20.

86. Stevens, D. L. 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis.* 1:69-78.

87. Stockbauer, K. E., L. Magoun, M. Liu, E. H. Burns, Jr., S. Gubba, S. Renish, X. Pan, S. C. Bodary, E. Baker, J. Coburn, J. M. Leong, and J. M. Musser.

1999. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A streptococcus with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins alphavbeta3 and alphaIIbbeta3 *Proc Natl Acad Sci., USA.* 96:242-7.

88. Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287(5459):1809-15.

89. Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, and O. Schneewind. 1999. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12424-12429.

90. von Heinje, G. 1987. Sequence Analysis in Molecular Biology. Academic Press, New York.

91. Weldingh, K., I. Rosenkrands, S. Jacobsen, P. B. Rasmussen, M. J. Elhay, and P. Andersen. 1998. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun.* 66:3492-500.

92. Wolff *et al.* 1990. *Science.* 247, 1465-1468.

93. Yutsudo, T., K. Okumura, M. Iwasaki, A. Hara, S. Kamitani, W. Minamide, H. Igarashi, and Y. Hinuma. 1994. The gene encoding a new mitogenic factor in a *Streptococcus pyogenes* strain is distributed only in group A streptococci. *Infection and Immunity.* 62:4000-4004.

94. Zagursky, R.J. and D. Russell. 2001. Bioinformatics: Use in Bacterial Vaccine Discovery. *BioTechniques.* 31:636-659.

The invention now being fully described, it will be apparent to one of ordinary skill in the art that many changes and modifications can be made thereto without departing from the spirit or scope of the invention as set forth herein. The foregoing describes the preferred embodiments of the present invention along with a number of possible alternatives. These embodiments, however, are merely for example and the invention is not restricted thereto.

What is claimed is:

1. A composition comprising:

(a) at least one protein comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS:444-452;

(b) at least one protein comprising an amino acid sequence that is encoded by a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to any of the polynucleotides that encode any of SEQ ID NOS: 444-452;

(c) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a) or (b); or

(d) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or (b) or immunogenic portion described in (c).

2. The composition of claim 1, wherein the at least one protein comprises the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS:444-449.

3. The composition of claim 1, wherein the at least one protein comprises any of SEQ ID NOS:450-452.

4. The composition of claim 1, wherein the at least one protein encoded by a polynucleotide that hydridizes under stringent conditions to a polynucleotide is encoded by the polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide that encodes any of SEQ ID NOS:444-449.

5. The composition of claim 1, wherein the at least one protein encoded by a polynucleotide that hydridizes under stringent conditions to a polynucleotide is encoded by the polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide that encodes any of SEQ ID NOS:450-452.

6. The composition of claim 1, wherein the composition additionally comprises at least one Por A, Por B, transferrin binding protein, or opacity protein (Opc).

7. The composition of claim 1, wherein the composition additionally comprises at least one additional surface antigen of *Neisseria species*, said additional surface antigen being a non-ORF2086 protein.

8. The composition of claim 1, wherein the at least one protein has a molecular weight of about 26,000 to about 30,000 as measured by mass spectroscopy.

9. The composition of claim 1, wherein the at least one protein has a molecular weight of about 28-35 kDa as measured on a 10%-20% SDS polyacrylamide gel.

10. The composition of claim 1, wherein said composition additionally comprises a pharmaceutically acceptable buffer, diluent, adjuvant or carrier.

11. The composition of claim 1, wherein said composition additionally comprises a carrier.

12. The composition of claim 1, wherein said composition additionally comprises an adjuvant.

13. The composition of claim 12, wherein said adjuvant comprises a liquid.

14. The composition of claim 1, wherein the protein is non-lipidated.

15. The composition of claim 1, wherein the protein is a recombinant protein.

16. The composition of claim 1, wherein the protein is isolated from native *Neisseria species*.

17. The composition of claim 1, wherein the protein is a lipoprotein.

18. The composition of claim 1, wherein said composition additionally comprises a polysaccharide.

19. The composition of claim 60, wherein said composition comprises an additional peptide, polypeptide or protein, said composition forming a conjugate that induces an immune response to two or more bacteria in a mammal.

20. A composition comprising:

(a) at least one protein comprising the amino acid sequence of any of odd numbered SEQ ID NOS:331-443;

(b) at least one protein encoded by a polynucleotide that hydridizes under stringent conditions to a polynucleotide comprising the nucleic acid sequence of any of even numbered SEQ ID NOS:330-442;

(c) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a) or (b); or

(d) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or (b) or immunogenic fragment described in (c).

21. The composition of claim 20, wherein the at least one protein comprises the amino acid sequence of any of odd numbered SEQ ID NOS:433-443.

23. The composition of claim 20, wherein the at least one protein comprises any of odd numbered SEQ ID NOS:331-431.

24. The composition of claim 20, wherein the at least one protein encoded by a polynucleotide that hydridizes under stringent conditions to a polynucleotide is encoded by the polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to any of even numbered SEQ ID NOS:432-442.

25. The composition of claim 20, wherein the at least one protein encoded by a polynucleotide that hydridizes under stringent conditions to a polynucleotide is encoded by the polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to any of even numbered SEQ ID NOS:330-430.

26. The composition of claim 20, wherein the composition additionally comprises at least one Por A, Por B, transferrin binding protein, or opacity protein (Opc).

27. The composition of claim 20, wherein the composition additionally comprises at least one additional surface antigen of *Neisseria species*, said additional surface antigen being a non-ORF2086 protein.

28. The composition of claim 20, wherein the at least one protein has a molecular weight of about 26,000 to about 30,000 as measured by mass spectroscopy.

29. The composition of claim 20, wherein the at least one protein has a molecular weight of about 28-35 kDa as measured on a 10%-20% SDS polyacrylamide gel.

30. A composition comprising:

at least one antigen of a first bacterial strain of *Neisseria species* that provides immunogenicity against infection of a subject by a second bacterial strain of *Neisseria species*;

wherein the first strain is strain M98 250716 of *Neisseria meningitidis* serogroup B and said second strain is another strain of *Neisseria meningitidis* serogroup B.

31. A composition comprising:

at least one antigen of a first bacterial strain of *Neisseria species* that provides immunogenicity against infection of a subject by a second bacterial strain of *Neisseria species*;

wherein the first strain is any of the strains selected from the group consisting of CDC-5315, B40, M97 250571, CDC-2367, CDC-1343, CDC-983 and CDC-852 of *Neisseria meningitidis* serogroup B and said second strain is another strain of *Neisseria meningitidis* serogroup B.

32. A composition comprising:

at least one isolated protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:301;

wherein x is any amino acid;

wherein the region from amino acid position 5 to amino acid position 8 is any of 0 to 4 amino acids;

wherein the region from amino acid position 66 to amino acid position 68 is any of 0 to 3 amino acids; and

wherein the at least one isolated protein further comprises the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS:444-449.

33. The composition of claim 32, wherein the region from amino acid position 5 to amino acid position 8 comprises 0 or 4 amino acids

34. The composition of claim 32, wherein the region from amino acid position 66 to amino acid position 68 comprises 0 or 3 amino acids.

35. A composition comprising:

at least one isolated protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:302;

wherein x is any amino acid;

wherein the region from amino acid position 8 to amino acid position 12 is any of 0 to 5 amino acids and

wherein the at least one isolated protein further comprises the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS:450-452.

36. The composition of claim 35, wherein the region from amino acid position 8 to amino acid position 12 comprises 0 or 5 amino acids.

37. A composition comprising:

at least one antibody that immunospecifically binds with any of:

(a) at least one protein comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS:444-452;

(b) at least one protein comprising an amino acid sequence that is encoded by a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to any of the polynucleotides that encode any of SEQ ID NOS: 444-452; or

(c) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a) or (b); or

(d) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or (b) or one immunogenic portion described in (c).

38. The composition of claim 37, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

39. The composition of claim 37, additionally comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

40. A composition comprising:

at least one antibody that immunospecifically binds with any of:

(a) at least one protein comprising any of odd numbered SEQ ID NOS:331 to 443; or

(b) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a); or

(c) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or one immunogenic fragment described in (b).

41. The composition of claim 40, wherein the at least one protein, immunogenic portion thereof or biological equivalent thereof comprises any of SEQ ID NOS:444-452.

42. The composition of claim 40, wherein the at least one antibody is a monoclonal antibody.

43. A composition comprising:

at least one polynucleotide that (a) encodes at least one isolated protein comprising any of SEQ ID NOS:444-452, or (b) hybridizes under stringent conditions to any of the polynucleotides described in (a).

44. The composition of claim 43, additionally comprising a P4 leader sequence (SEQ ID NO. 322).

45. The composition of claim 43, wherein said composition comprises a vector.

46. The composition of claim 43, wherein the stringent conditions are high stringency southern hybridization conditions.

47. The composition of claim 43, wherein the polynucleotide is a recombinant polynucleotide.

48. The composition of claim 43, wherein the polynucleotide is isolated from a natural source.

49. The composition of claim 43, wherein said composition additionally comprises a nucleic acid sequence encoding for an additional peptide, polypeptide or protein.

50. A composition comprising:

a vector comprising any of:

(a) at least one protein comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS:444-452; or

(b) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a); or

(c) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or immunogenic fragment described in (b).

51. The composition of claim 50, wherein the vector is a plasmid.

52. The composition of claim 50, wherein the vector is a phage.

53. The composition of claim 50, wherein the vector is a bacteriophage.

54. The composition of claim 50, wherein the vector is a moderate phage.

55. A composition comprising:

a vector comprising at least one polynucleotide that encodes a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:300;

wherein x is any amino acid;

wherein the region from amino acid position 5 to amino acid position 9 is any of 0 to 5 amino acids;

wherein the region from amino acid position 67 to amino acid position 69 is any of 0 to 3 amino acids;

wherein amino acid position 156 is any of 0 to 1 amino acid; and

wherein the protein further comprises any of SEQ ID NOS:444-449.

56. A composition comprising:

a vector comprising any of:

(a) at least one polynucleotide that encodes at least one of the polypeptides of the odd numbered SEQ ID NOS: 331-443; or

(b) at least one polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to at least one polynucleotide of (a).

57. The composition of claim 56, wherein the vector comprises the nucleic acid sequence of any of even numbered SEQ ID NOS:330-442.

58. A composition comprising:

a host cell transformed/transfected or infected with a vector, said vector comprising any of:

(a) at least one protein encoded by an open reading frame of *Neisseria species* (ORF2086), said open reading frame encoding a crossreactive immunogenic antigen, and said crossreactive immunogenic antigen providing immunogenicity against infection by *Neisseria meningitidis* serogroup B in a subject; or

(b) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a); or

(c) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or immunogenic fragment described in (b).

59. A composition comprising:

a host cell transformed/transfected or infected with a vector, said vector comprising any of :

(a) at least one protein comprising any of SEQ ID NOS:444-452; or

(b) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a); or

(c) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or immunogenic portion described in (b).

60. A composition prepared by a process comprising:

isolating and purifying from *Neisseria species* any of:

(a) at least one protein encoded by an open reading frame of *Neisseria species* (ORF2086), said open reading frame encoding a crossreactive immunogenic antigen, and said crossreactive immunogenic antigen providing immunogenicity against infection by *Neisseria meningitidis* serogroup B in a subject; or

(b) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a); or

(c) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or immunogenic fragment described in (b); and

wherein the at least one polynucleotide comprises the nucleic acid sequence of any of the even numbered SEQ ID NOS:330-442.

61. The composition of claim 60, wherein the process further comprises introducing a non-native leader sequence to the at least one isolated polynucleotide.

62. The composition of claim 61, wherein the non-native leader sequence is P4 leader sequence (SEQ ID NO. 322).

63. A composition prepared by a process comprising:

isolating and purifying from *Neisseria species* any of:

(a) at least one protein comprising any of SEQ ID NOS:444-452; or

(b) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a); or

(c) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or immunogenic portion described in (b).

64. A composition prepared by a process comprising:

isolating and purifying from *Neisseria species* any of:

(a) at least one protein comprising the amino acid sequence of any of odd numbered SEQ ID NOS:331-443;

(b) at least one protein encoded by a polynucleotide that hydridizes under stringent conditions to a polynucleotide comprising the nucleic acid sequence of any of even numbered SEQ ID NOS:330-442;

(c) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a) or (b); or

(d) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or (b) or immunogenic fragment described in (c).

65. A composition comprising:

at least one immunogenic non-strain specific *Neisseria meningitidis* antigen, said antigen being nonpathogenic and substantially free from any infectious impurities;

wherein the antigen comprises an amino acid sequence having at least about 70% amino acid sequence identity to any of odd numbered SEQ ID NOS:331-443.

66. Use of the composition of any of claims 1-65 in the preparation of a medicament for inducing an immune response in a mammal.

67. The use according to claim 66, wherein said composition is administered parenterally.

68. The use according to claim 66, wherein said composition is administered mucosally.

69. The use of the composition of any of claims 1-65 in a medicament effective against bacterial meningitis in a mammal.

70. The use of the composition according to claim 69, wherein said composition is administered parenterally.

71. The use of the composition according to claim 69, wherein said composition is administered mucosally.

72. The use of the composition according to claim 69, wherein the composition is administered by subcutaneous or intramuscular injection.

73. A method of preparing a composition comprising:

expressing in a host cell a nucleic acid sequence encoding any of:

(a) at least one protein encoded by an open reading frame of *Neisseria species* (ORF2086), said open reading frame encoding a crossreactive immunogenic antigen, and said crossreactive immunogenic antigen providing immunogenicity against infection by *Neisseria meningitidis* serogroup B in a subject; or

(b) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a); or

(c) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or immunogenic fragment described in (b); and

wherein the at least one protein comprises any of the SEQ ID NOS: 444-452.

74. The method of claim 73, wherein the nucleic acid sequence is expressed *in vivo*.

75. The method of claim 73, wherein the nucleic acid sequence is expressed *in vitro*.

76. The method of claim 73, further comprising associating a P4 leader sequence (SEQ ID NO. 322).

77. A method of preparing a composition comprising:

isolating and purifying from *N. meningitidis* at least one polynucleotide that (a) encodes at least one protein encoded by an open reading frame of *Neisseria species* (ORF2086) or at least one immunogenic portion or biological equivalent of said at least one protein, said open reading frame encoding a crossreactive immunogenic antigen, and said crossreactive immunogenic antigen providing immunogenicity against infection by *Neisseria meningitidis* serogroup B in a subject; or (b) hybridizes under stringent conditions to any of the polynucleotides described in (a).

78. The method of claim 77, wherein the stringent conditions are high stringency southern hybridization conditions.

79. A method of preparing a composition comprising:

BC1

isolating and purifying from *Neisseria species* any of the proteins, immunogenic portions or biological equivalents described herein.

80. A method of preparing an antibody composition comprising:

recovering antibodies from an animal after introducing into the animal a composition comprising any of the proteins, immunogenic portions or biological equivalents described herein.

81. A method of inducing an immune response in a mammal comprising:

administering to the mammal an effective amount of one or more of the compositions of claims 1-65.

82. The method of claim 81, wherein said composition is administered parenterally.

83. The method of claim 81, wherein said composition is administered mucosally.

84. A method of preventing or treating bacterial meningitis in a mammal comprising:

administering to the mammal an effective amount of one or more of the compositions of claims 1-65.

85. The method of claim 84, wherein said composition is administered parenterally.

86. The method of claim 84, wherein said composition is administered mucosally.

87. The method of claim 84, wherein the composition is administered by subcutaneous or intramuscular injection.

88. A method of preventing or treating bacterial meningitis in a mammal comprising:

administering to the mammal an effective amount of an antibody composition comprising antibodies that immunospecifically bind with a protein, immunogenic portion or biological equivalent comprising the amino acid sequence of any of the odd numbered SEQ ID NOS: 331-443 or any of the SEQ ID NOS: 444-452.

89. The method of claim 88, wherein the antibody composition is administered parenterally.

90. The method of claim 88, wherein the antibody composition is administered mucosally.

91. The method of claim 88, wherein the antibody composition is administered by subcutaneous or intramuscular injection.

92. A method of preparing a composition comprising:

expressing in a host cell a nucleic acid sequence encoding any of:

(a) at least one protein comprising the amino acid sequence of any of odd numbered SEQ ID NOS:331-443 or any of the SEQ ID NOS: 254-299;

(b) at least one protein encoded by a polynucleotide that hydridizes under stringent conditions to a polynucleotide comprising the nucleic acid sequence of any of even numbered SEQ ID NOS:330-442;

(c) at least one immunogenic portion of at least one protein described in (a) or (b); or

(d) at least one biological equivalent of at least one protein described in (a) or (b) or immunogenic fragment described in (c).

93. The method of claim 92, wherein the nucleic acid sequence is expressed *in vivo*.

94. The method of claim 92, wherein the nucleic acid sequence is expressed *in vitro*.

95. The method of claim 92, wherein the vector is a plasmid.

96. The method of claim 92, wherein the vector is a phage.

97. The method of claim 92, further comprising associating a non-native leader sequence with said at least one isolated polynucleotide.

98. The method of claim 97, wherein the non-native leader sequence is P4 leader sequence (SEQ ID NO. 267).

99. A method of preparing an antibody composition comprising:

recovering antibodies from an animal after introducing into the animal a composition comprising:

(a) at least one protein comprising the amino acid sequence of any of the odd numbered SEQ ID NOS:331-443 or the amino acid squence of any of SEQ ID NOS:444-452; or

(b) at least one protein encoded by a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to the polynucleotide of any of the even numbered SEQ ID NOS: 330-442.

100. The method of claim 99, wherein the stringent conditions are high stringency southern hybridization conditions.

101. A transformed/transfected or infected cell line comprising:

a recombinant cell that expresses a nucleic acid sequence that (a) encodes at least one isolated protein comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS:444-452, or (b) hybridizes under stringent conditions to any of the polynucleotides described in (a).

102. A transformed/transfected or infected cell line comprising:

a recombinant cell that expresses a nucleic acid sequence that (a) encodes at least one protein encoded by an open reading frame of *Neisseria species* (ORF2086) or at least one immunogenic portion or biological equivalent of said at least one protein, said open reading frame encoding a crossreactive immunogenic antigen, and said crossreactive immunogenic antigen providing immunogenicity against infection by *Neisseria meningitidis* serogroup B in a subject or (b) hybridizes under stringent conditions to any of the polynucleotides of (a); or

a recombinant cell that expresses a nucleic acid sequence encoding: (c) at least one polypeptide encoded by any of (a) or (b); or (d) at least one polypeptide comprising the amino acid sequence of any of the odd numbered SEQ ID NOS:331-443.

103. The transformed/transfected or infected cell line of claim 102, wherein the polypeptide is a monoclonal antibody.

104. The transformed/transfected or infected cell line of claim 102, wherein the recombinant cell is a hybridoma.

105. The transformed/transfected or infected cell line of claim 102, wherein the recombinant cell is a trioma.

106. A transformed/transfected or infected cell line comprising:

a recombinant cell that expresses a nucleic acid sequence comprising:

(a) at least one polynucleotide that encodes a protein comprising any of the odd numbered SEQ ID NOS:331-443;

(b) at least one polynucleotide comprising the nucleic acid sequence of any of the even numbered SEQ ID NOS:330-442;

(c) at least one polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to any of (a) or (b); or

a recombinant cell that expresses a nucleic acid sequence encoding:

(d) at least one polypeptide encoded by any of (a), (b) or (c); or

(e) at least one polypeptide comprising the amino acid sequence of any of the odd numbered SEQ ID NOS:331-443.

107. The transformed/transfected or infected cell line of claim 106, wherein the polypeptide is a monoclonal antibody.

108. The transformed/transfected or infected cell line of claim 106, wherein the recombinant cell is a hybridoma.

109. The transformed/transfected or infected cell line of claim 106, wherein the recombinant cell is a trioma.

110. A composition as substantially hereinbefore described.

111. A use substantially as hereinbefore described.

IDENTIFICATION OF COMPONENTS IN THE UNABSORBED TMAE FRACTION: SDS-PAGE ISOLATION OF PEPTIDES

(CNBr CLEAVAGE OF UNABSORBED TMAE FRACTION FOLLOWED BY SDS-PAGE.AND N-TERM SEQUENCING OF FRAGMENTS FROM PVDF BLOT)

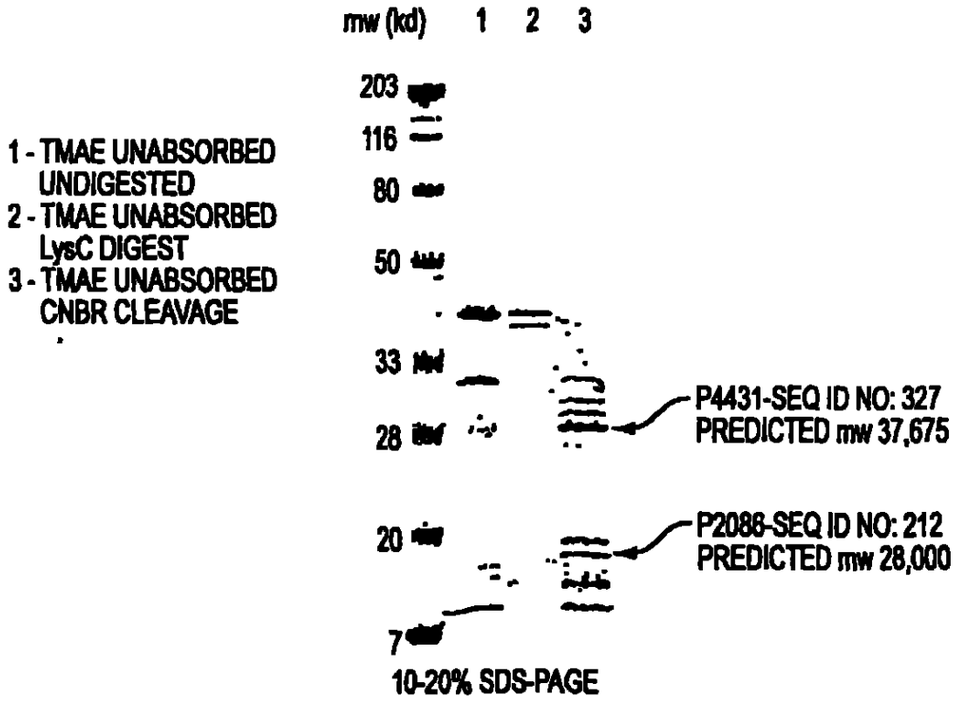


FIG. 1A

IDENTIFICATION OF COMPONENTS IN THE UNABSORBED TMAE FRACTION: REVERSE PHASE ISOLATION OF PEPTIDES

ENZYMATIC DIGESTION OF UNABSORBED TMAE FRACTION FOLLOWED BY REVERSE PHASE CHROMATOGRAPHY SEPARATION OF PEPTIDES AND DIRECT N-TERMINAL SEQUENCING

ENZYMATIC DIGEST	RETENTION TIME OF PEPTIDE (min)	MOLECULAR WEIGHT OF PEPTIDE (d)	N-TERM. ID
GluC (V8)	6.716	2069.7	P5163
LysC	13.800	3351.2	P4431
LysC	13.800	3351.2	P2086
ArgC	6.860	2278.9	P5163

P4431 (SEQ ID NO: 327)
PREDICTED mw 36,775

P2086 (SEQ ID NO: 212)
PREDICTED mw 27,100

P5163 (SEQ ID NO: 328)
PREDICTED mw 7,081

FIG. 1B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

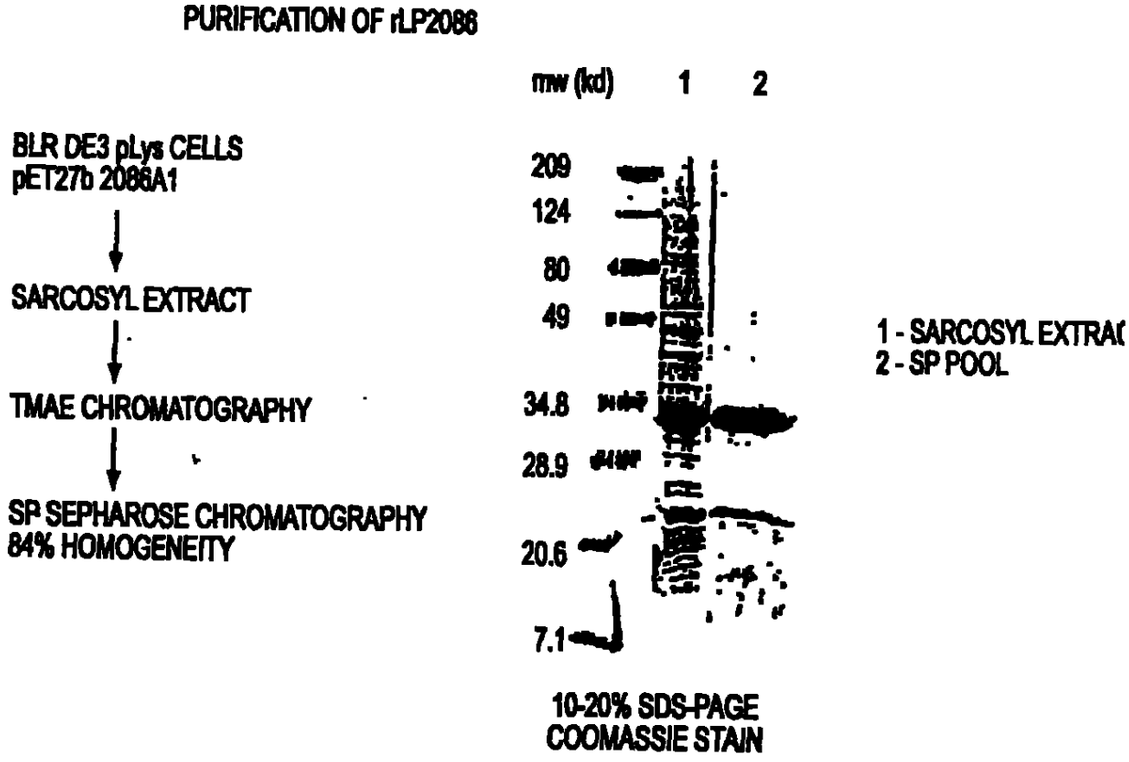

PURIFICATION OF rLP2086
BLR DE3 pLys CELLS
pET27b 2086A1
SARCOSYL EXTRACT
TMAE CHROMATOGRAPHY
SP SEPHAROSE CHROMATOGRAPHY
84% HOMOGENEITY
mw (kd)
1
2
209
124
80
49
34.8
28.9
20.6
7.1
1 - SARCOSYL EXTRAC
2 - SP POOL
10-20% SDS-PAGE
COOMASSIE STAIN

FIG. 2

IDENTIFICATION OF COMPONENTS IN THE UNABSORBED TMAE FRACTION: LC-MS/MS

SDS-PAGE FOLLOWED BY GEL EXCISION, PROTEOLYTIC DIGESTION, AND LC-MS/MS ANALYSIS (LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY)

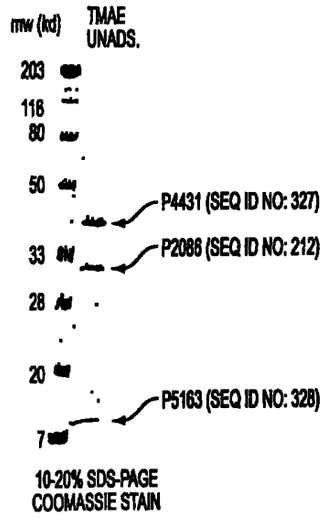


FIG. 3

EXPRESSION OF rLP2086

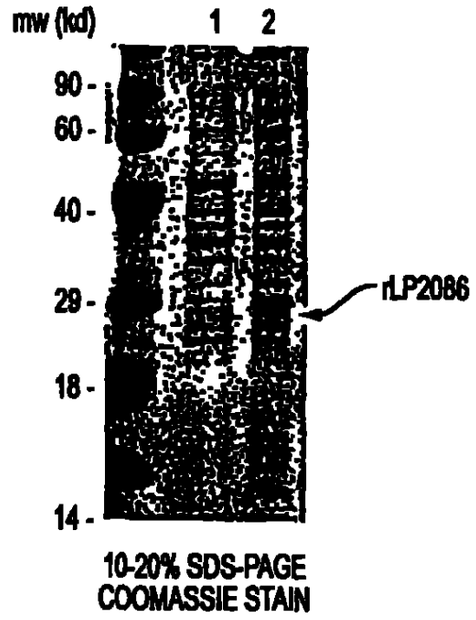


FIG. 4

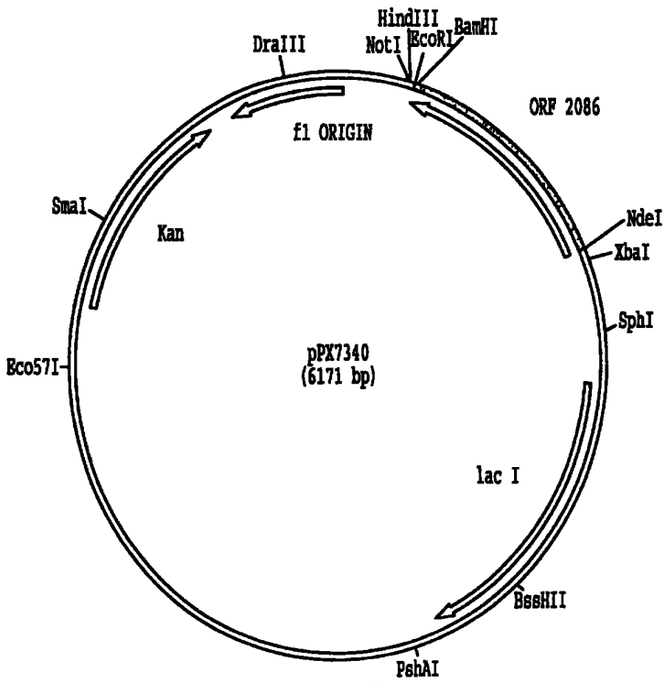

HindIII
BamHI
DraIII
NotI
EcoRI
ORF 2086
f1 ORIGIN
SmaI
Kan
NdeI
XbaI
SphI
pPX7340
(6171 bp)
Eco57I
lac I
BssHII
PshAI

FIG. 5

WO 2004/094596

PCT/US2004/011901

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

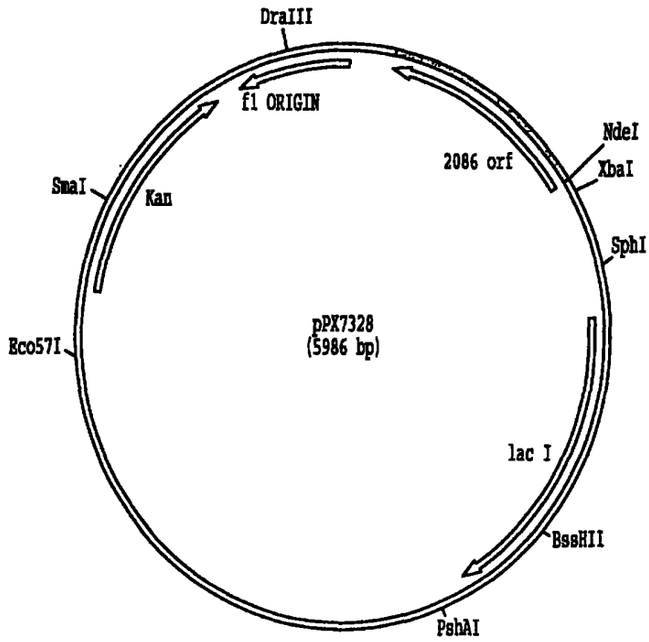


FIG. 6

WO 2004/094596

8/22

PCT/US2004/011901

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

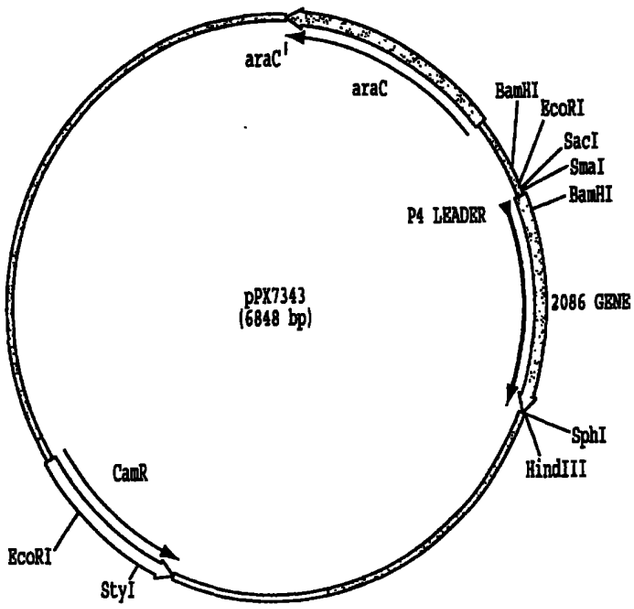


FIG. 7

10
20
30
1 C S S G G G G - - - - - V A A D I G A G L A D A L T A P L D 8529 mat.pro
1 C S S G G G G - - - - - V A A D I G A G L A D A L T A P L D 2996 mat.pro
1 C S S G G G G S G G G G V T A D I G T G L A D A L T A P L D 1573 mat.pro
5 AMINO ACID REPEAT

FIG. 8

WO 2004/094596

PCT/US2004/011961

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

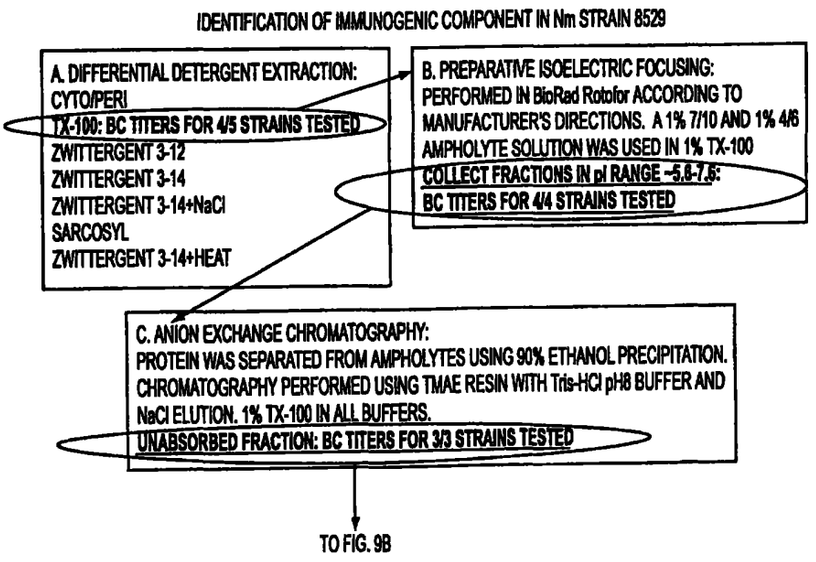


FIG. 9A

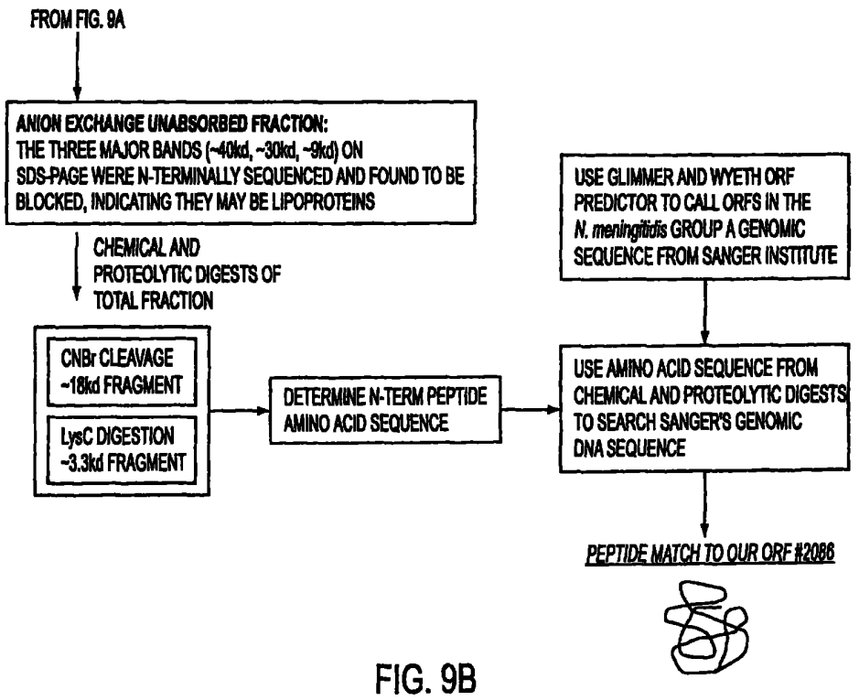

FROM FIG. 9A
ANION EXCHANGE UNABSORBED FRACTION:
THE THREE MAJOR BANDS (~40kd, ~30kd, ~9kd) ON
SDS-PAGE WERE N-TERMINALLY SEQUENCED AND FOUND TO BE
BLOCKED, INDICATING THEY MAY BE LIPOPROTEINS
CHEMICAL AND
PROTEOLYTIC DIGESTS OF
TOTAL FRACTION
CNBr CLEAVAGE
~18kd FRAGMENT
LysC DIGESTION
~3.3kd FRAGMENT
DETERMINE N-TERM PEPTIDE
AMINO ACID SEQUENCE
USE GLIMMER AND WYETH ORF
PREDICTOR TO CALL ORFS IN THE
N. meningitidis GROUP A GENOMIC
SEQUENCE FROM SANGER INSTITUTE
USE AMINO ACID SEQUENCE FROM
CHEMICAL AND PROTEOLYTIC DIGESTS
TO SEARCH SANGER'S GENOMIC
DNA SEQUENCE
PEPTIDE MATCH TO OUR ORF #2086

FIG. 9B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

LIPIDATED rP2086
pBAD18-ARABINOSE PROMOTER

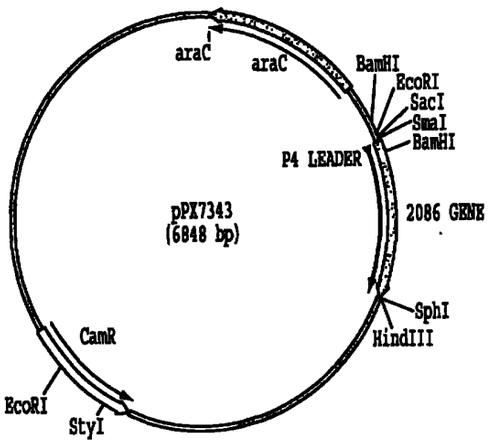


FIG.10A

NON-LIPIDATED rP2086
pET9a-T7 PROMOTER
8529, CDC-1573 AND 2996

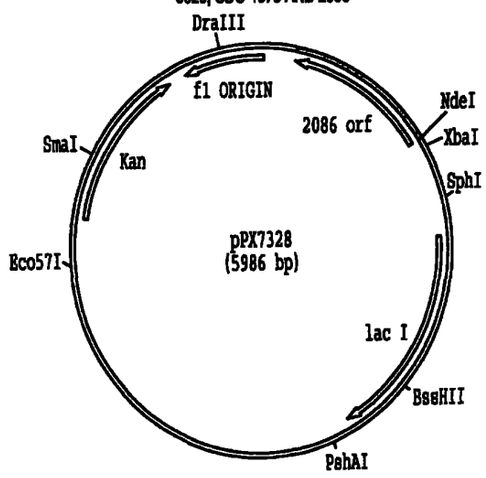


FIG. 10B

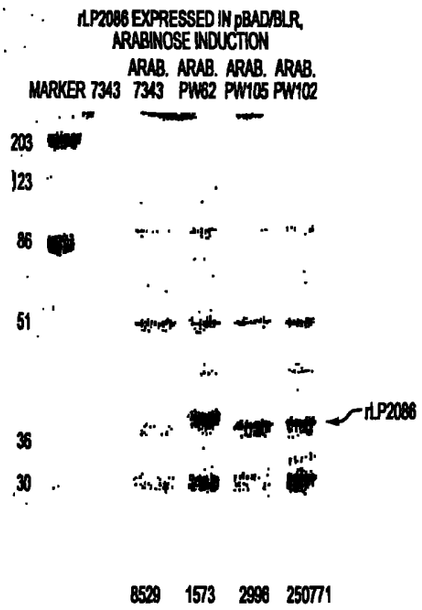


FIG. 11A

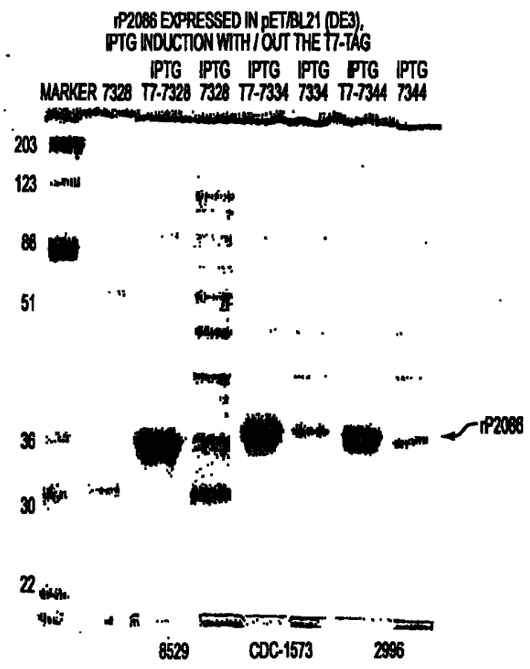


FIG. 11B

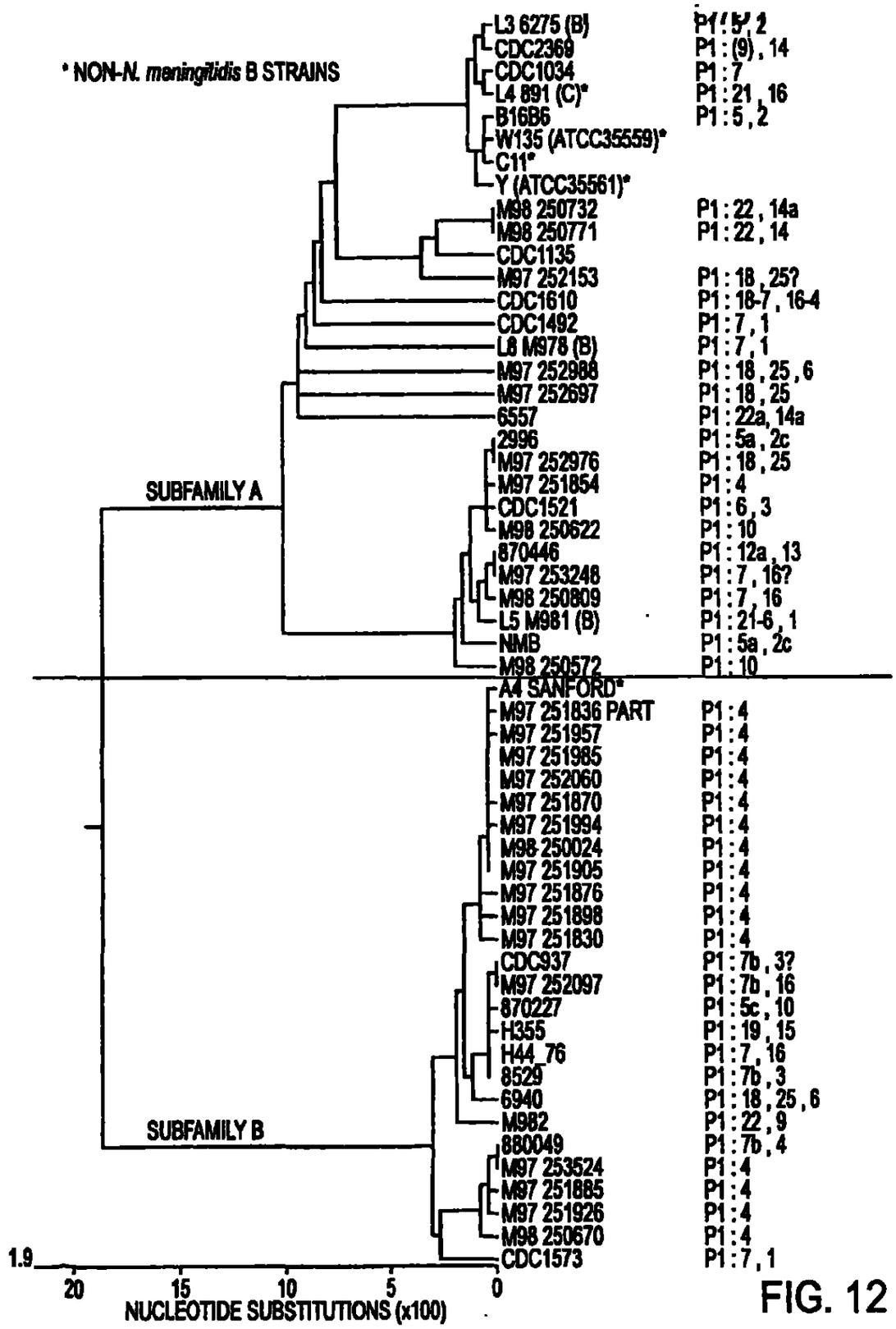

* NON-N. meningitidis B STRAINS
L3 6275 (B) P1 : 5 , 2
CDC2369 P1 : (9) , 14
CDC1034 P1 : 7
L4 891 (C)* P1 : 21 , 16
B16B6 P1 : 5 , 2
W135 (ATCC35559)*
C11*
Y (ATCC35561)*
M98 250732 P1 : 22 , 14a
M98 250771 P1 : 22 , 14
CDC1135
M97 252153 P1 : 18 , 25?
CDC1610 P1 : 18-7 , 16-4
CDC1492 P1 : 7 , 1
L8 M978 (B) P1 : 7 , 1
M97 252988 P1 : 18 , 25 , 6
M97 252697 P1 : 18 , 25
6557 P1 : 22a, 14a
2996 P1 : 5a , 2c
M97 252976 P1 : 18 , 25
M97 251854 P1 : 4
SUBFAMILY A
CDC1521 P1 : 6 , 3
M98 250622 P1 : 10
870446 P1 : 12a , 13
M97 253248 P1 : 7 , 16?
M98 250809 P1 : 7 , 16
L5 M981 (B) P1 : 21-6 , 1
NMB P1 : 5a , 2c
M98 250572 P1 : 10
A4 SANFORD*
M97 251836 PART P1 : 4
M97 251957 P1 : 4
M97 251985 P1 : 4
M97 252060 P1 : 4
M97 251870 P1 : 4
M97 251994 P1 : 4
M98 250024 P1 : 4
M97 251905 P1 : 4
M97 251876 P1 : 4
M97 251898 P1 : 4
M97 251830 P1 : 4
CDC937 P1 : 7b , 3?
M97 252097 P1 : 7b , 16
870227 P1 : 5c , 10
H355 P1 : 19 , 15
H44_76 P1 : 7 , 16
8529 P1 : 7b , 3
6940 P1 : 18 , 25 , 6
M982 P1 : 22 , 9
SUBFAMILY B
880049 P1 : 7b , 4
M97 253524 P1 : 4
M97 251885 P1 : 4
M97 251926 P1 : 4
M98 250670 P1 : 4
CDC1573 P1 : 7 , 1
1.9
20 15 10 5 0
NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS (x100)

FIG. 12

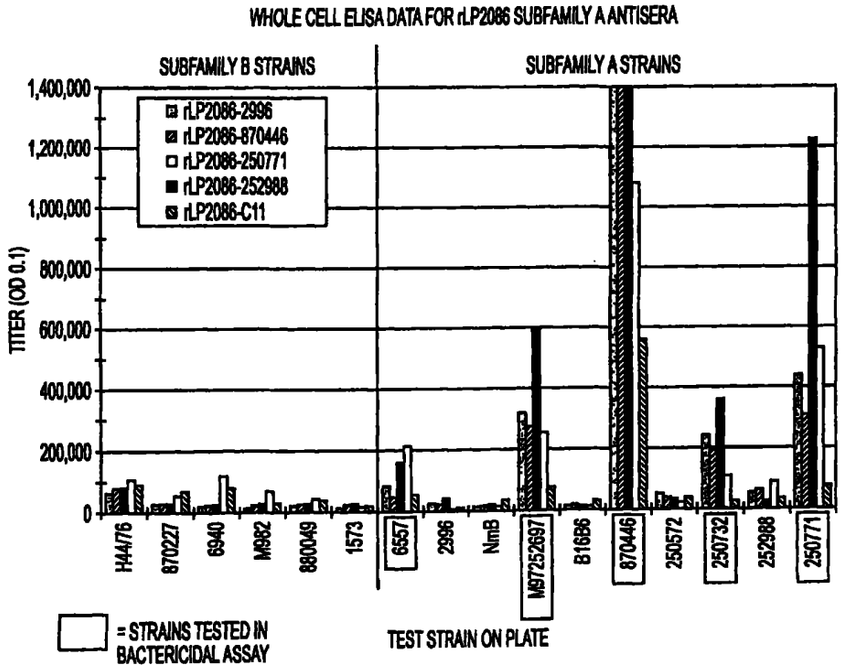


FIG. 13

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

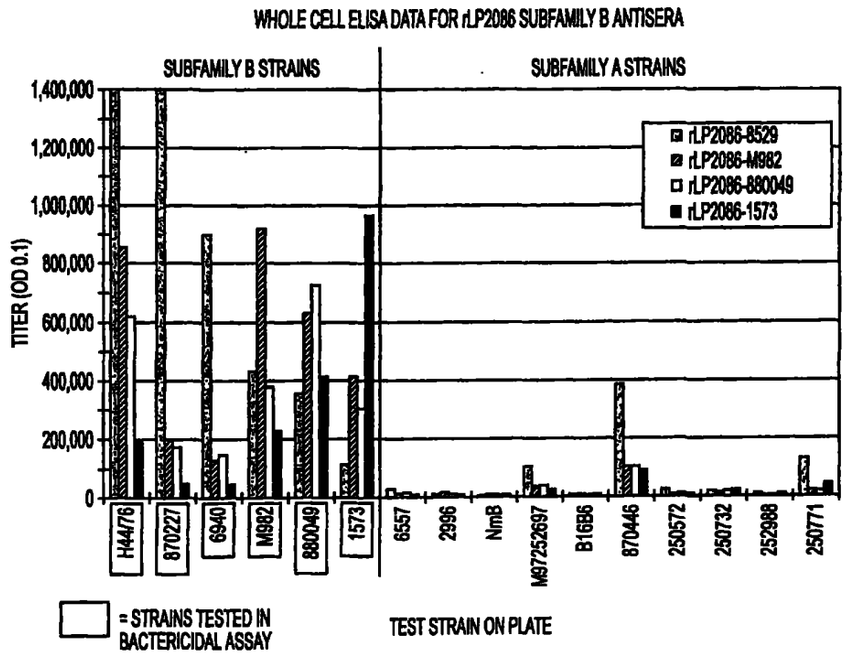


FIG. 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

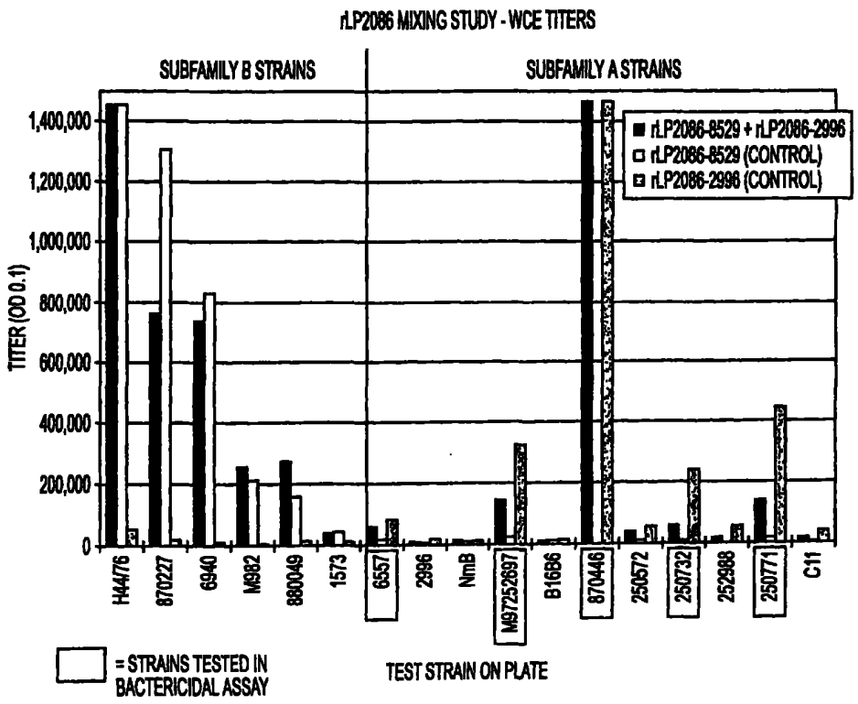


FIG. 15

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

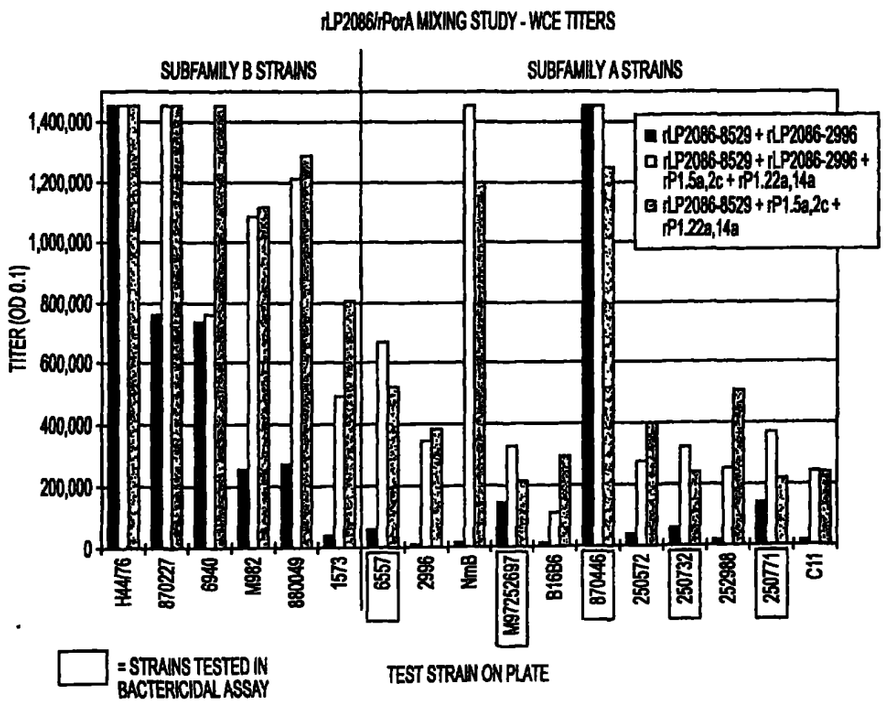
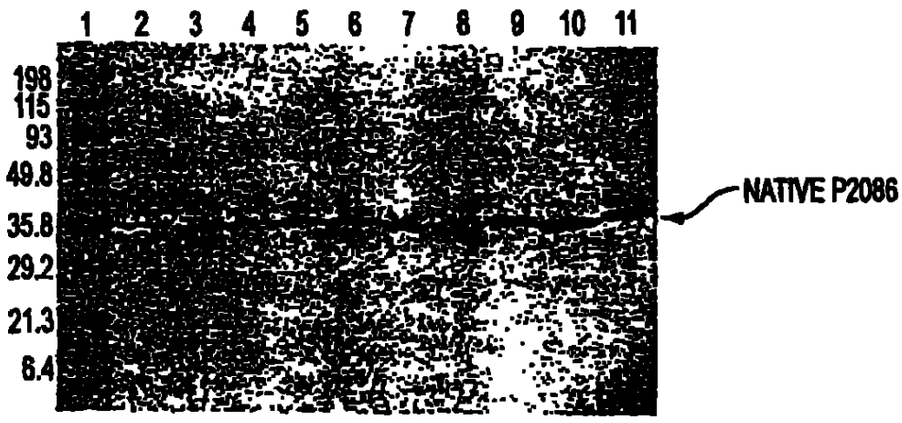

rLP2086/rPorA MIXING STUDY - WCE TITERS
SUBFAMILY B STRAINS
SUBFAMILY A STRAINS
TITER (OD 0.1)
1,400,000
1,200,000
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
rLP2086-8529 + rLP2086-2996
rLP2086-8529 + rLP2086-2996 + rP1.5a,2c + rP1.22a,14a
rLP2086-8529 + rP1.5a,2c + rP1.22a,14a
H44/76
870227
6940
M982
880049
1573
6557
2996
NmB
M97252697
B16B6
870446
250572
250732
252988
250771
C11
= STRAINS TESTED IN BACTERICIDAL ASSAY
TEST STRAIN ON PLATE

FIG. 16

WESTERN BLOT REACTIVITY OF *rLP2086* MOUSE ANTISERA TO P2086 SUBFAMILY B *N. meningitidis* WHOLE CELL LYSATES



1 - MOLECULAR WEIGHT MARKER (kDa)
2 - M97 251985
3 - CDC937
4 - 6940
5 - M97 251926
6 - CDC1573
7 - CDC1359
8 - CDC1658
9 - M97 252026
10 - M97 252029
11 - M982

SUBFAMILY B P2086 CELL LYSATES ARE ALL GROUP B *N. meningitidis*

FIG. 17

WESTERN BLOT REACTIVITY OF rLP2086 MOUSE ANTISERA TO P2086 SUBFAMILY A *N. meningitidis* AND *N. lactamica* WHOLE CELL LYSATES



1 - MOLECULAR WEIGHT MARKERS (kDa)
2 - GROUP A *N. meningitidis* A4 (P2086 SUBFAMILY B)
3 - GROUP C *N. meningitidis* - C11
4 - GROUP Y *N. meningitidis* - ATCC35561
5 - GROUP W135 *N. meningitidis* - ATCC35559
6 - *N. lactamica* - UR5

GROUP B *N. meningitidis*:
7 - CDC1034
8 - M98 250732
9 - NmB
10 - 6557
11 - CDC1521
12 - M97 252153

FIG. 18

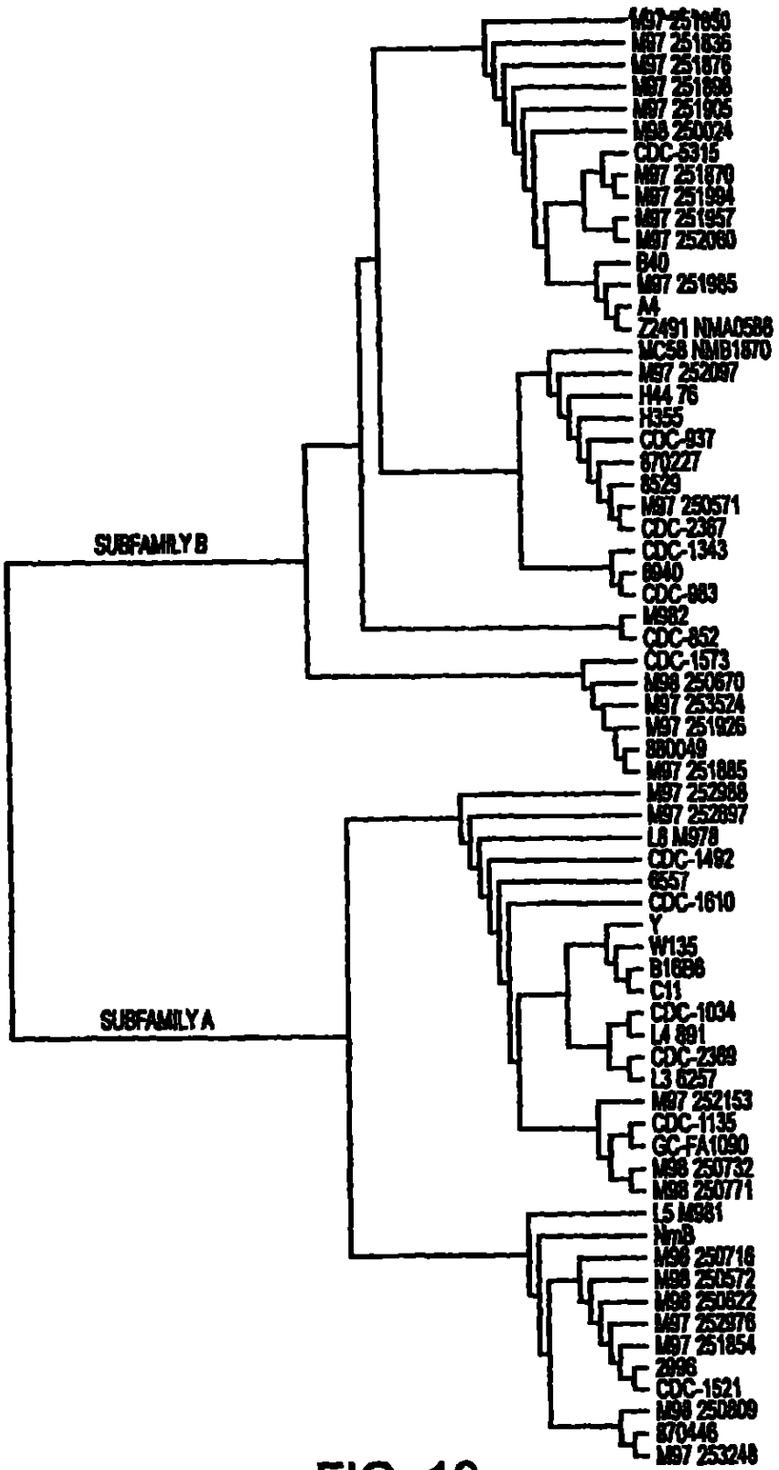

M97 251950
M97 251835
M97 251876
M97 251998
M97 251905
M98 250024
CDC-5315
M97 251870
M97 251994
M97 251957
M97 252060
B40
M97 251985
A4
Z2491 NMA0586
MC58 NMB1870
M97 252097
H44 76
H355
CDC-937
870227
8529
M97 250571
CDC-2367
CDC-1343
6940
CDC-983
M982
CDC-852
CDC-1573
M98 250670
M97 253524
M97 251926
880049
M97 251885
M97 252956
M97 252897
L6 M978
CDC-1492
6557
CDC-1610
Y
W135
B16B6
C11
CDC-1034
L4 891
CDC-Z369
L3 6257
M97 252153
CDC-1135
GC-FA1090
M98 250732
M98 250771
L5 M981
NmB
M98 250718
M98 250572
M98 250622
M97 252976
M97 251854
2996
CDC-1521
M98 250809
870446
M97 253248
SUBFAMILY B
SUBFAMILY A

FIG. 19

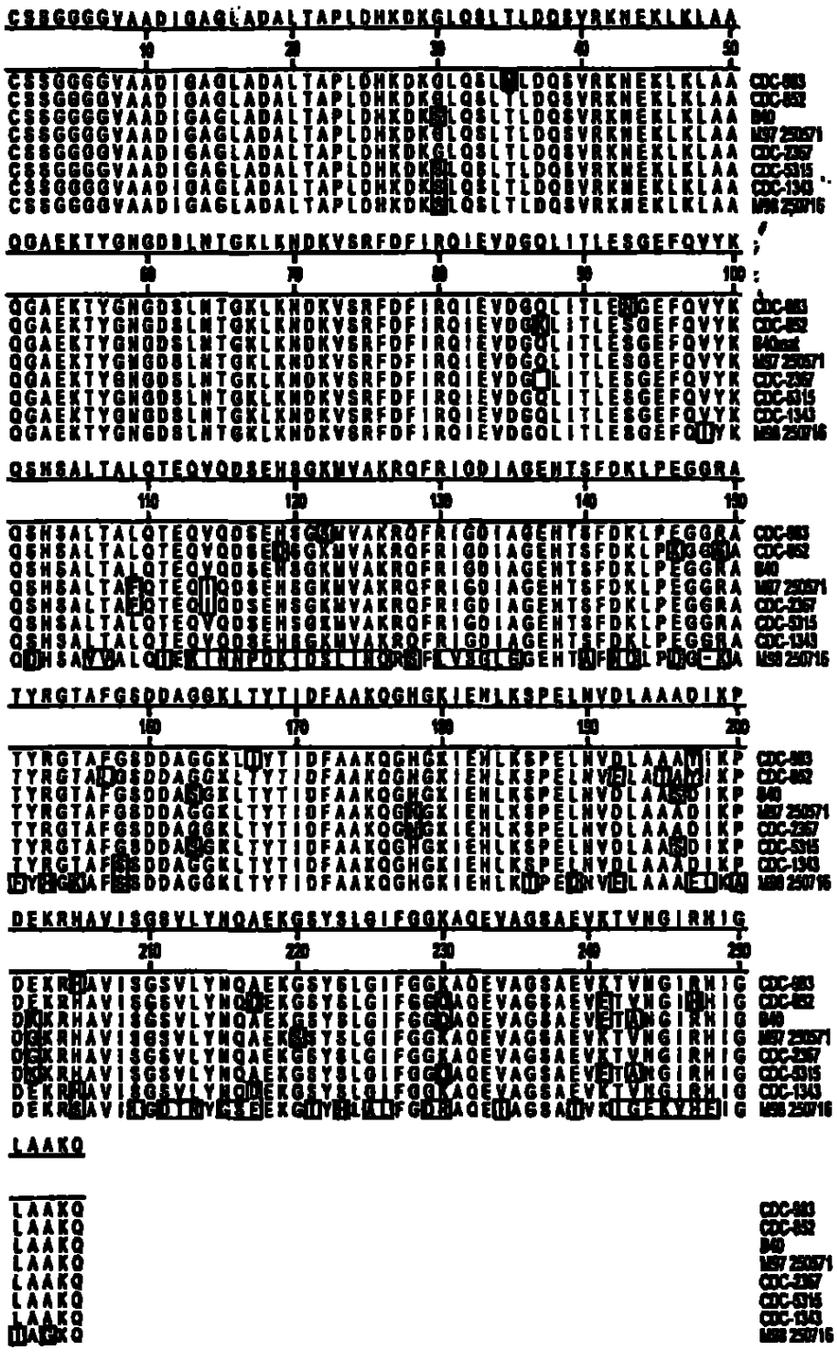


FIG. 20

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS NOVEDOSAS PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD MENINGOCOCAL

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con proteínas de *Neisseria* ORF2086 (Subfamilia A y subfamilia B), las cuales pueden ser aisladas de cepas bacterianas tales como aquellas de *Neisseria species*, incluyendo cepas de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, B, C, D, W-135, X, Y, Z y 29E), *Neisseria gonorrhoeae, y Neisseria lactamica*, así como también porciones inmunogénicas y/o equivalentes biológicos de dichas proteínas. La presente invención también se relaciona con anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a dichas proteínas, las porciones inmunogénicas y/o los equivalentes biológicos. Además, la presente invención se relaciona con oligonucleótidos aislados que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las anteriores proteínas, porciones inmunogénicas, equivalentes biológicos y/o anticuerpos. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con composiciones inmunogénicas y su uso para prevenir, tratar y/o diagnosticar infección meningococal causada por *N. meningitidis*, y en particular enfermedad meningococal causada por el serogrupo de *N. meningitidis*, así

como también métodos para preparar dichas composiciones. Esta invención se relaciona tanto con las formas recombinantes como con las formas aisladas de una fuente natural, así como también las formas lipidadas y no lipidadas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La meningitis meningococal es una enfermedad devastadora que puede matar niños y adultos jóvenes después de horas a pesar de la disponibilidad de antibióticos. Pizza *et al.*, 2000, *Science* 287: 1816-1820. La meningitis se caracteriza como una inflamación de las meninges que resulta en dolor de cabeza intenso, fiebre, pérdida del apetito, intolerancia a la luz y sonido, rigidez de los músculos, especialmente en el cuello, y en casos severos convulsiones, vómito y delirio que conduce a la muerte. Los síntomas de la meningitis meningococal aparecen repentinamente y culminan en la septicemia meningococal con su característica erupción hemorrágica. Un diagnóstico rápido y un tratamiento inmediato con grandes dosis de antibióticos son críticos si se desea alguna oportunidad de supervivencia. 2000. *Bantam Medical Dictionary, Tercera Edición 302.*

La meningitis meningococal es originada por la *Neisseria meningitidis* (el meningococo), una bacteria Gram-negativa,

encapsulada que se ha clasificada en varios serogrupos patógenos que incluyen A, B, C, D, W-135, X, Y, Z y 29E. Las cepas del serogrupo B de *N. meningitidis* son una causa principal de la enfermedad meningococal en todo el mundo. Por ejemplo, se reportó en la literatura médica que el serogrupo es el responsable de aproximadamente el 50% de la meningitis bacterial en infantes y en niños que residen en Estados Unidos y en Europa. No existe ninguna vacuna para evitar la enfermedad meningococal originada por el serogrupo B de *N. meningitidis*.

El desarrollo de una composición inmunogénica para la prevención de la enfermedad meningococal del serogrupo B ha sido un reto para los investigadores desde el trabajo de Goldschneider *et al.* hace más de treinta años. Goldschneider *et al.*, 1969, *J. Exp. Med* 129(6):1307-26; Goldschneider *et al.*, 1969, *J. Exp. Med* 129(6):1307-48; Gotschlich *et al.*, 1969, *J. Exp. Med* 129(6):1385-95; y Gotschlich *et al.*, 1969, *J. Exp. Med* 129(6):1367-84. A diferencia de la enfermedad del serogrupo A, que eventualmente desaparecieron de Norteamérica después de la Segunda Guerra Mundial, Achtman, M., 1995, *Trends in Microbiology* 3(5): 186-92, la enfermedad originada por los organismos del serogrupo B y C permanece endémica a lo largo de la mayor parte del mundo económicamente desarrollado. La incidencia de la enfermedad varía desde

<1/100000 donde la enfermedad endémica es rara a 200/100000 en poblaciones de alto riesgo durante epidemias.

Las vacunas basadas en conjugados de polisacárido han sido desarrolladas contra *N. meningitidis* serogrupos A y C y parecen ser efectivas para prevenir la enfermedad. Habitualmente, se encuentra disponible una composición inmunogénica hecha de polisacárido capsular de los serogrupos A, C, Y, & W-135. Ambrosch *et al.*, 1983, Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent. *Bulletin of the World Health Organization* 61(2): 317-23. Sin embargo, esta composición inmunogénica elicita una respuesta inmuno independiente de las células T, no es efectiva en jóvenes, y no suministra cubrimiento para las cepas del serogrupo B, lo cual causa incremento del 50% de la enfermedad meningococal.

Otros también han intentado desarrollar composiciones inmunogénicas que utilizan polisacáridos capsulares. Recientemente, las composiciones inmunogénicas para enfermedad del serogrupo C preparadas por conjugaciones del material capsular del serogrupo C a proteínas se ha licenciado para uso en Europa. Sin embargo, la cápsula del serogrupo C puede ser inadecuada como un candidato para vacuna en razón a que el polisacárido de la cápsula está compuesto de ácido polisiálico el cual tiene una similitud

con las porciones de carbohidrato sobre el desarrollo de los tejidos neurales humanos. Esta porción de azúcar es reconocida como un auto-antígeno y es por lo tanto pobremente inmunogénico en humanos.

Han sido desarrolladas las proteínas de la membrana exterior (OMP) como antígenos alternativos para vacuna para la enfermedad del serogrupo B. El anticuerpo monoclonal que se une a las dos regiones variables del PorA define el esquema serosubtipo para los meningococos. Las proteínas PorA sirven así como antígenos del serosubtipo (Abdillahi *et al.*, 1988, *Microbial Patogénesis* 4(1): 27-32) para las cepas meningococales y están siendo activamente investigadas como componentes de una composición inmunogénica del serogrupo B (Poolman, 1996, *Adv. Exp. Med. Biol.* 397: 73-7), en razón a que ellos pueden elicitar anticuerpos bacteriales (Saukkonen, 1987, *Microbial Patogénesis* 3(4): 261-7). Los anticuerpos bacterianos se considera que son un indicador de protección y cualquier nuevo candidato a composición inmunogénica debe elicitar estos anticuerpos funcionales.

Los estudios en humanos así como también en animales indican que el antígeno del serosubtipo, PorA, elicita anticuerpos bactericidas. Sin embargo, la respuesta inmune al PorA es generalmente específica del serosubtipo. En particular, los

datos del serosubtipo indican que una composición inmunogénica hecha de PorAs puede requerir un PorA para cada serosubtipo a ser cubierto mediante tal composición inmunogénica, quizás tanto como seis a nueve. Por lo tanto, 6-9 PorAs serán necesarios para cubrir 70-80% de las cepas del serogrupo B. Así, la naturaleza variable de esta proteína requiere una composición de vacuna multivalente para proteger contra un número suficiente de aislados clínicos de serosubtipo meningococal.

El desarrollo de una composición inmunogénica para los meningococos del serogrupo B han sido tan difíciles que recientemente varios grupos han secuenciado el genoma de las cepas que representan ambos serogrupos A y B para ayudar a identificar nuevos candidatos a composición inmunogénica. Tettelin, 2000, *Science*, 287(5459): 1809-15; Pizza *et al.*, 2000, *Science* 287: 1816-1820. Identificando nuevos candidatos a composición inmunogénica, aún con el conocimiento del genoma neisserial, es un proceso difícil para el cual los algoritmos matemáticos adecuados no existen normalmente. De hecho, en recientes reportes se indica que a pesar de identificar cientos de marcos de lectura abierta ("ORF") que contienen dominios teóricos que se extienden a la membrana, los problemas con la expresión, purificación, e inducir superficie reactiva, y anticuerpos funcionalmente activos ha

conducido a los investigadores a solo siete candidatos para una composición inmunogénica meningococal del serogrupo B. *Ver Id.* Uno de estos era previamente conocido.

De acuerdo con esto, subsiste la necesidad para composiciones inmunogénicas que (1) elicite anticuerpos bactericidas a múltiples cepas neiseriales; (2) reaccione con la superficie de múltiples cepas; (3) confiera protección pasiva contra un desafío vivo; y/o (4) evitar colonización.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Para cumplir estas y otras necesidades, y en vista de sus propósitos, la presente invención suministra proteínas de *Neisseria* ORF2086 ("proteínas 2086"), que incluyen las proteínas de la Subfamilia A 2086 y las proteínas de la Subfamilia B 2086. Cada una de estas proteínas 2086 son proteínas que pueden ser aisladas de cepas neiseriales nativas, que incluyen cepas de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, B, C, D, W-135, X, Y, Z y 29E), *Neisseria gonorrhoeae, y Neisseria lactamica*. Las proteínas 2086 también se pueden preparar utilizando tecnología recombinante.

En particular, la presente invención suministra proteínas 2086, porciones inmunogénicas de estas, y/o equivalentes biológicos de estas, anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a cualquiera de las anteriores, y polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las anteriores. La presente invención incluye composiciones, composiciones inmunogénicas y su uso para prevenir, tratar y/o diagnosticar infección meningococal, y en particular enfermedad meningococal originada por *N. meningitidis*, así como también métodos para preparar dichas composiciones. Las proteínas 2086 incluyen aquí formas recombinantes y formas aisladas de una fuente natural, así como también tanto las formas lipidadas como no lipidadas.

La presente invención inesperada y ventajosamente suministra composiciones que (1) elicitan anticuerpos bacteriales a múltiples cepas neiseriales, tales como las cepas de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, y/o *N. lactamica*; (2) reaccionan con la superficie de múltiples cepas; (3) confieren protección pasiva contra un desafío vivo y/o (4) evitan la colonización, así como también métodos para utilizar dichas composiciones y métodos para preparar dichas composiciones. Varias modalidades de la invención se describen adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1A describe un gel SDS-PAGE que describe dos proteínas principales de las fracciones de proteína obtenidas de los experimentos para identificar el extracto de proteína de membrana neiserial que es capaz de elicitar anticuerpos bacterianos contra cepas heterólogas.

La FIG. 1B describe los resultados de los experimentos de la identificación de las dos proteínas principales mediante análisis de Flujo TMAE a través de los componentes mediante digestión de proteasa y secuenciación N-terminal de Fase inversa.

La FIG. 2 describe el esquema de purificación y la homogeneidad determinada mediante SDS-PAGE de rLP2086.

La FIG. 3 describe los resultados de los experimentos provenientes de la identificación de las dos proteínas mayores y una proteína menor mediante el análisis de Flujo TMAE a través de los componentes mediante LC-MS/MS y el correspondiente SDS-PAGE.

La FIG. 4 es un gel SDS-PAGE proveniente de la expresión recombinante de la proteína 2086.

La FIG. 5 es un diagrama esquemático del plásmido pPX7340, como se describió en los ejemplos que aparecen aquí.

La FIG. 6 es un diagrama esquemático del plásmido pPX7328 como se describió en los ejemplos que aparecen aquí.

La FIG. 7 es un diagrama esquemático del plásmido pPX7343 como se describió en los ejemplos que aparecen aquí.

La FIG. 8 ilustra las regiones N-terminales del gen 2086 de varias cepas.

La FIG. 9A es un diagrama de flujo que muestra las etapas preliminares en la identificación del componente inmunogénico en una cepa neiserial.

La FIG. 9B es un diagrama de flujo que muestra las etapas finales en la identificación de un componente inmunogénico en una cepa neiserial.

La FIG. 10A es un diagrama esquemático del promotor inducible de arabinosa pBAD que deriva la expresión de la señal

P4/proteína de fusión ORF2086 para expresar una forma lipidada de rP2086 como se describió en los ejemplos realizados aquí.

La FIG. 10B es un diagrama esquemático del vector pET9a-T7 para expresión recombinante de la forma no lipidada del ORF2086.

La FIG. 11A es una fotografía que representa los lisados de célula completos de *E. coli* B que expresan la proteína rLP2086.

La FIG. 11B muestra los lisados de célula completos de *E. coli* B que expresan la proteína rP2086.

La FIG. 12 es un árbol filogenético que muestra una organización de las subfamilias y grupos de las proteínas ORF2086 de acuerdo con una implementación de la presente invención.

La FIG. 13 es una ilustración gráfica de los datos de ELISA de célula completo para el antisuero de la Subfamilia A de rLP2086.

La FIG. 14 es una ilustración gráfica de los datos ELISA de células completas para el antisuero de la Subfamilia B de rLP2086.

La FIG. 15 es una ilustración gráfica de los resultados del estudio mezclado rLP2086 - Títulos WCE.

La FIG. 16 es una ilustración gráfica de los resultados del estudio mezclado rLP2086/rPorA - Títulos WCE.

La FIG. 17 es un Western Blot que muestra reactividad de antisuero de ratón rLP2086 a lisados de célula completos de *N. meningitidis* Subfamilia B P2086.

La FIG. 18 es un Western Blot que muestra reactividad de antisuero de ratón rLP2086 a lisados de célula completos de *N. lactamica* y *N. meningitidis* Subfamilia A P2086.

La FIG. 19 es un árbol filogenético que muestra una organización de subfamilias y grupos de proteínas ORF2086 de acuerdo con una implementación de la invención.

La FIG. 20 es una alineación de secuencia que compara los polipéptidos de la presente invención.

RESUMEN DE SECUENCIAS

ID DE SEC NOS. Para Secuencias Estudiadas:

ID DE SEC NO: 1 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa L3 6275 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 2 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa L3 6275 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 3 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura proveniente de L3 6275 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 4 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa L3 6275 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 5 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa L3 6275.

ID DE SEC NO: 6 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa L3 6275.

ID DE SEC NO: 7 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa CDC2369 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 8 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa CDC2369 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 9 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de CDC2369 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 10 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa CDC2369 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 11 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa CDC2369.

ID DE SEC NO: 12 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de cepa CDC2369.

ID DE SEC NO: 13 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1034 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 14 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1034 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 15 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de CDC1034 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 16 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1034 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 17 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1034.

ID DE SEC NO: 18 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1034.

ID DE SEC NO: 19 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L4 891 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 20 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L4 891 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 21 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de L4 891 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 22 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L4 891 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 23 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L4 891.

ID DE SEC NO: 24 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L4 891.

ID DE SEC NO: 25 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B16B6 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 26 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B16B6 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 27 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de B16B6 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 28 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B16B6 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 29 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B16B6.

ID DE SEC NO: 30 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B16B6.

ID DE SEC NO: 31 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa W135 (ATCC35559) cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 32 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa W135 (ATCC35559) preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 33 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de W135 (ATCC35559) cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 34 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa W135 (ATCC35559) preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 35 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa W135 (ATCC35559).

ID DE SEC NO: 36 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa W135 (ATCC35559).

ID DE SEC NO: 37 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa C11 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 38 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa C11 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 39 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de C11 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 40 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa C11 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 41 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa C11.

ID DE SEC NO: 42 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa C11.

ID DE SEC NO: 43 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa Y (ATCC35561) cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 44 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa Y (ATCC35561) preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 45 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de Y (ATCC35561) cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 46 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa Y (ATCC35561) preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 47 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa Y (ATCC35561).

ID DE SEC NO: 48 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa Y (ATCC35561).

ID DE SEC NO: 49 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la

cepa M98 250732 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 50 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250732 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 51 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M98 250732 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 52 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250732 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 53 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250732.

ID DE SEC NO: 54 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250732.

ID DE SEC NO: 55 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250771 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 56 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250771 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 57 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M98 250771 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 58 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250771 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 59 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250771.

ID DE SEC NO: 60 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250771.

ID DE SEC NO: 61 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1135 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 62 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1135 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 63 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de CDC1135 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 64 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1135 preparada utilizando una secuencia líder P4.

184

ID DE SEC NO: 65 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1135.

ID DE SEC NO: 66 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1135.

ID DE SEC NO: 67 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252153 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 68 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252153 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 69 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M97 252153 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 70 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252153 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 71 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252153.

ID DE SEC NO: 72 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252153.

ID DE SEC NO: 73 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la

cepa CDC1610 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 74 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1610 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 75 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de CDC1610 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 76 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1610 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 77 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1610.

ID DE SEC NO: 78 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1610.

ID DE SEC NO: 79 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1492 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 80 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1492 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 81 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de CDC1492 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 82 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1492 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 83 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1492.

ID DE SEC NO: 84 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1492.

ID DE SEC NO: 85 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L8 M978 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 86 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L8 M978 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 87 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de L8 M978 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 88 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L8 M978 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 89 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L8 M978.

ID DE SEC NO: 90 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L8 M978.

ID DE SEC NO: 91 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252988 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 92 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252988 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 93 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M97 252988 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 94 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252988 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 95 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252988.

ID DE SEC NO: 96 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252988.

ID DE SEC NO: 97 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la

cepa M97 252697 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 98 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252697 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 99 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M97 252697 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 100 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252697 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 101 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252697.

ID DE SEC NO: 102 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252697.

ID DE SEC NO: 103 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6557 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 104 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6557 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 105 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de 6557 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 106 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6557 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 107 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6557.

ID DE SEC NO: 108 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6557.

ID DE SEC NO: 109 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 2996 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 110 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 2996 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 111 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de 2996 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 112 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 2996 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 113 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 2996.

ID DE SEC NO: 114 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 2996.

ID DE SEC NO: 115 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252976 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 116 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252976 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 117 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M97 252976 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 118 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252976 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 119 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252976.

ID DE SEC NO: 120 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252976.

ID DE SEC NO: 121 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

la cepa M97 251854 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 122 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 251854 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 123 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M97 251854 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 124 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 251854 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 125 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 251854.

ID DE SEC NO: 126 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 251854.

ID DE SEC NO: 127 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1521 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 128 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1521 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 129 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de CDC1521 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 130 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1521 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 131 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1521.

ID DE SEC NO: 132 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1521.

ID DE SEC NO: 133 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250622 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 134 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250622 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 135 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M98 250622 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 136 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250622 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 137 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250622.

ID DE SEC NO: 138 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250622.

ID DE SEC NO: 139 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870446 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 140 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870446 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 141 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de 870446 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 142 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870446 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 143 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870446.

ID DE SEC NO: 144 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870446.

ID DE SEC NO: 145 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

la cepa M97 253248 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 146 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 253248 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 147 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M97 253248 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 148 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 253248 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 149 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 253248.

ID DE SEC NO: 150 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 253248.

ID DE SEC NO: 151 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250809 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 152 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250809 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 153 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M98 250809 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 154 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250809 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 155 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250809.

ID DE SEC NO: 156 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250809.

ID DE SEC NO: 157 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L5 M981 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 158 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L5 M981 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 159 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de L5 M981 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 160 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L5 M981 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 161 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L5 M981.

ID DE SEC NO: 162 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa L5 M981.

ID DE SEC NO: 163 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa NMB cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 164 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa NMB preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 165 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de NMB cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 166 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa NMB preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 167 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa NMB.

ID DE SEC NO: 168 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa NMB.

ID DE SEC NO: 169 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

la cepa M98 250572 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 170 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250572 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 171 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M98 250572 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 172 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250572 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 173 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250572.

ID DE SEC NO: 174 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250572.

ID DE SEC NO: 175 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870 ; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876 ; M97 251898; o M97 251830 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 176 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98

250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; o M97 251830 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 177 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; o M97 251830 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 178 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985 ; M97 252060; M97 251870 ; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; o M97 251830 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 179 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa A4 Sanford; M97 251836 part; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; o M97 251830.

ID DE SEC NO: 180 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; o M97 251830.

ID DE SEC NO: 181 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

la cepa CDC937 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 182 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC937 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 183 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de CDC937 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 184 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC937 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 185 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC937.

ID DE SEC NO: 186 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC937.

ID DE SEC NO: 187 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252097 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 188 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252097 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 189 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M97 252097 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 190 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252097 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 191 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252097.

ID DE SEC NO: 192 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 252097.

ID DE SEC NO: 193 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870227 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 194 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870227 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 195 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de 870227 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 196 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870227 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 197 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870227.

ID DE SEC NO: 198 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 870227.

ID DE SEC NO: 199 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H355 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 200 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H355 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 201 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de H355 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 202 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H355 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 203 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H355.

ID DE SEC NO: 204 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H355.

ID DE SEC NO: 205 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

202

la cepa H44_76 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 206 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H44_76 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 207 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H44_76 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 208 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H44_76.

ID DE SEC NO: 209 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de H44_76 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 210 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa H44_76.

ID DE SEC NO: 211 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 8529 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 212 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 8529 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 213 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de 8529 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 214 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 8529 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 215 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 8529.

ID DE SEC NO: 216 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 8529.

ID DE SEC NO: 217 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6940 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 218 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6940 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 219 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de 6940 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 220 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6940 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 221 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6940.

ID DE SEC NO: 222 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 6940.

ID DE SEC NO: 223 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M982 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 224 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M982 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 225 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M982 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 226 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M982 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 227 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M982.

ID DE SEC NO: 228 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M982.

ID DE SEC NO: 229 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

la cepa 880049 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 230 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 880049 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 231 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de 880049 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 232 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 880049 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 233 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 880049.

ID DE SEC NO: 234 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa 880049.

ID DE SEC NO: 235 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de las cepas M97 253524, M97 251885, y M97 251926 cuando se combinan con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 236 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de las cepas M97 253524, M97 251885, y M97 251926 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 237 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

las cepas M97 253524, M97 251885, y M97 251926 cuando se combinan con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 238 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de las cepas M97 253524, M97 251885, y M97 251926 preparadas utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 239 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de las cepas M97 253524, M97 251885, y M97 251926.

ID DE SEC NO: 240 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de las cepas M97 253524, M97 251885, y M97 251926.

ID DE SEC NO: 241 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250670 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 242 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250670 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 243 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de M98 250670 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 244 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250670 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 245 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250670.

ID DE SEC NO: 246 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250670.

ID DE SEC NO: 247 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1573 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 248 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1573 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 249 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de CDC1573 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 250 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1573 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 251 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1573.

ID DE SEC NO: 252 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC1573.

ID DE SEC NO: 253 secuencia de ácido nucleico parcial que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de una cepa de *Neisseria lactamica*.

ID DE SEC NOS: 254 a 259 secuencias de aminoácidos asociadas con proteínas de la familia de proteínas 2086.

ID DE SEC NOS: 260 a 278 secuencias de aminoácidos asociadas con proteínas de la Subfamilia A 2086.

ID DE SEC NOS: 279 a 299 secuencias de aminoácidos asociadas con proteínas de la Subfamilia B 2086.

ID DE SEC NO: 300 es la secuencia de consenso de aminoácido que corresponde a la familia de proteína 2086 ("proteínas 2086") de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

ID DE SEC NO: 301 es la secuencia de consenso de aminoácido que corresponde a la Subfamilia A de la proteína 2086 de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

ID DE SEC NO: 302 es la secuencia de consenso de aminoácido que corresponde a la Subfamilia B de la proteína 2086 de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

ID DE SEC NO: 303 secuencia de ácido nucleico para el cebador inverso con sitio de restricción BamHI (Compuesto No. 4623).

ID DE SEC NO: 304 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero con el sitio de restricción NdeI (Compuesto No. 4624).

ID DE SEC NO: 305 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero (Compuesto No. 4625).

ID DE SEC NO: 306 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero (Compuesto No. 5005).

ID DE SEC NO: 307 secuencia de ácido nucleico para el cebador inverso (Compuesto No. 5007).

ID DE SEC NO: 308 secuencia de ácido nucleico para el cebador inverso con sitio de restricción Bg1II (Compuesto No. 5135).

ID DE SEC NO: 309 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero con sitio de restricción BamHI (Compuesto No. 5658).

ID DE SEC NO: 310 secuencia de ácido nucleico para el cebador inverso con sitio de restricción SphI (Compuesto No. 5660).

ID DE SEC NO: 311 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero con sitio de restricción BamHI (Compuesto No. 6385).

ID DE SEC NO: 312 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero con sitios de restricción Bg1II y NdeI (Compuesto No. 6406).

ID DE SEC NO: 313 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero (Compuesto No. 6470).

ID DE SEC NO: 314 secuencia de ácido nucleico para el cebador inverso (Compuesto No. 6472).

ID DE SEC NO: 315 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero con sitio de restricción BamHI (Compuesto 6473).

ID DE SEC NO: 316 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero con sitios de restricción Bg1II y NdeI (Compuesto No. 6474).

ID DE SEC NO: 317 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero (Compuesto No. 6495).

ID DE SEC NO: 318 secuencia de ácido nucleico para el cebador inverso (Compuesto No. 6496).

ID DE SEC NO: 319 secuencia de ácido nucleico para el cebador inverso con sitio de restricción SphI (Compuesto No. 6543).

ID DE SEC NO: 320 secuencia de ácido nucleico para el cebador inverso con sitio de restricción Bg1II (Compuesto No. 6605).

ID DE SEC NO: 321 secuencia de ácido nucleico para el cebador delantero con sitios de restricción Bg1II y NdeI (Compuesto No. 6721).

ID DE SEC NO: 322 secuencia de ácido nucleico para la secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 323 secuencia de ácido nucleico para la variante líder 1 2086 nativa.

ID DE SEC NO: 324 secuencia de ácido nucleico para la variante líder 2 2086 nativa.

ID DE SEC NO: 325 secuencia de ácido nucleico para la variante líder 3 2086 nativa.

ID DE SEC NO: 326 secuencia de ácido nucleico para la variante líder 4 2086 nativa.

ID DE SEC NO: 327 es la secuencia de aminoácido de P4431.

ID DE SEC NO: 328 es la secuencia de aminoácido de P5163.

ID DE SEC NO: 329 es una secuencia de aminoácido de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

ID DE SEC NO: 330 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa 880049 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 331 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa 880049 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 332 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa 880049 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 333 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa 880049 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 334 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa 880049.

ID DE SEC NO: 335 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa 880049.

ID DE SEC NO: 336 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-937 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 337 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-937 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 338 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-937 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 339 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-937 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 340 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-937.

ID DE SEC NO: 341 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-937.

ID DE SEC NO: 342 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 252097 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 343 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 252097 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 344 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 252097 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 345 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 252097 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 346 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 252097.

ID DE SEC NO: 347 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 252097.

ID DE SEC NO: 348 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa B40 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 349 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa B40 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 350 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa B40 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 351 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa B40 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 352 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa B40.

ID DE SEC NO: 353 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa B40.

ID DE SEC NO: 354 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B40 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 355 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B40 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 356 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B40 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 357 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B40 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 358 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B40.

ID DE SEC NO: 359 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa B40.

ID DE SEC NO: 360 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-1343 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 361 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-1343 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 362 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-1343 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 363 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-1343 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 364 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-1343.

ID DE SEC NO: 365 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-1343.

ID DE SEC NO: 366 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-1343 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 367 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-1343 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 368 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-1343 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 369 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-1343 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 370 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-1343.

ID DE SEC NO: 371 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-1343.

ID DE SEC NO: 372 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-2367 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 373 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-2367 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 374 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-2367 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 375 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-2367 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 376 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-2367.

ID DE SEC NO: 377 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-2367.

ID DE SEC NO: 378 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

la cepa CDC-2367 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 379 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-2367 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 380 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-2367 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 381 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-2367 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 382 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-2367.

ID DE SEC NO: 383 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-2367.

ID DE SEC NO: 384 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-5315 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 385 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-5315 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 386 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-5315 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 387 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-5315 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 388 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-5315.

ID DE SEC NO: 389 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-5315.

ID DE SEC NO: 390 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-5315 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 391 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-5315 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 392 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-5315 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 393 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-5315 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 394 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-5315.

ID DE SEC NO: 395 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-5315.

ID DE SEC NO: 396 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-852 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 397 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-852 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 398 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-852 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 399 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-852 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 400 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-852.

ID DE SEC NO: 401 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-852.

ID DE SEC NO: 402 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de

la cepa CDC-852 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 403 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-852 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 404 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-852 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 405 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-852 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 406 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-852.

ID DE SEC NO: 407 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-852.

ID DE SEC NO: 408 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-983 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 409 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-983 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 410 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-983 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 411 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-983 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 412 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-983.

ID DE SEC NO: 413 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa CDC-983.

ID DE SEC NO: 414 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-983 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 415 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-983 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 416 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-983 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 417 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-983 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 418 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-983.

ID DE SEC NO: 419 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa CDC-983.

ID DE SEC NO: 420 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 250571 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 421 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 250571 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 422 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 250571 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 423 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 250571 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 424 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 250571.

ID DE SEC NO: 425 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M97 250571.

ID DE SEC NO: 426 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 250571 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 427 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 250571 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 428 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 250571 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 429 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 250571 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 430 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 250571.

ID DE SEC NO: 431 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M97 250571.

ID DE SEC NO: 432 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M98 250716 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 433 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M98 250716 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 434 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M98 250716 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 435 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M98 250716 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 436 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M98 250716.

ID DE SEC NO: 437 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 de la cepa M98 250716.

ID DE SEC NO: 438 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250716 cuando se combina con una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 439 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250716 preparada utilizando una secuencia líder nativa.

ID DE SEC NO: 440 secuencia de ácido nucleico para codificar una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250716 cuando se combina con una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 441 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250716 preparada utilizando una secuencia líder P4.

ID DE SEC NO: 442 secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250716.

ID DE SEC NO: 443 secuencia de aminoácido para la proteína 2086 madura de la cepa M98 250716.

ID DE SEC NOS: 444 a 449 secuencias de aminoácidos asociadas con proteínas de la Subfamilia B 2086.

ID DE SEC NOS: 450 a 452 secuencias de aminoácidos asociadas con proteínas de la Subfamilia A 2086.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Una nueva clase de antígenos con actividad bactericida con función cruzada contra el serogrupo B *Neisseria meningitidis* obviaría la necesidad de una aproximación PorA multivalente para la inmunización contra la infección. Tal antígeno ha sido inesperadamente identificado y se describe y se reivindica aquí. La presencia de tal antígeno se observó primero en una mezcla de complejo de proteínas de membrana exterior soluble (sOMPs) de una cepa meningococal. La actividad bactericida de este antígeno fue seguida a través de una serie de etapas de fraccionamiento y purificación de proteína hasta que la mezcla de proteína de interés contenía solo unas pocas proteínas. Las proteínas mayores en esta mezcla se identificaron mediante la secuenciación de aminoácido N-terminal y el mapeo de péptido. La proteína de interés que exhibe actividad bactericida se identificó como la proteína ORF2086, una proteína lipidada (también más

especificamente denominada como LP2086). La "proteína ORF2086" se refiere a una proteína codificada por un marco de lectura abierta 2086 (ORF2086) de *Neisseria species*.

Como se describe aquí, los nuevos candidatos a composición inmunogénica basados en la proteína ORF2086 de *Neisseria species* (también denominada como "proteína 2086" o proteína "ORF2086", se utiliza intercambiablemente aquí, o P2086 para las proteínas no lipidadas y LP2086 para la versión lipidada de las proteínas) aislada de *N. meningitidis* se identificaron al combinar el fraccionamiento celular, la extracción del detergente diferencia, la purificación de proteína, con la preparación de antisuero, y un ensayo de actividad bactericida utilizando cepas múltiples. Como una alternativa a las composiciones y diagnósticos inmunogénicos potenciales descritos en la referencia citada anteriormente, esta invención se relaciona con las composiciones y métodos para tratar y/o prevenir infecciones meningococales a través del uso de proteínas, porciones inmunogénicas de éstas y equivalentes biológicos de estos, así como también genes que codifican tales polipéptidos, porciones y equivalentes, y anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente al mismo.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, los agentes inmunogénicos basados en proteína 2086, que incluyen

polipéptidos aislados, porciones inmunogénicas de estos y/o equivalentes biológicos de estos fueron inesperadamente identificados como candidatos inmunogénicos basados en la capacidad de dichos agentes para exhibir reactividad cruzada o no especificidad de cepa. En particular, los candidatos fueron identificados que demostraron inesperadamente la capacidad para (1) elicitar anticuerpos bactericidas a cepas neiseriales y/o gonococcales múltiples; (2) reaccionar con la superficie de las cepas múltiples; (3) conferir protección pasiva contra un desafío vivo; y/o (4) evitar la colonización. De acuerdo con esto, la presente invención suministra composiciones inmunogénicas que comprenden dichos agentes inmunogénicos, incluyendo polipéptidos aislados, porciones inmunogénicas de estos y/o equivalentes biológicos de estos, así como también métodos para utilizar los mismos contra infección por *N. meningitidis*. (Ver Ejemplo 1 aquí para la metodología utilizada en la identificación de la proteína 2086).

Como se utiliza aquí, el término "no específico de cepa" se refiere a las características de un antígeno para elicitar una respuesta inmune efectiva contra más de una cepa de *N. meningitidis* (por ejemplo, cepas meningococales heterólogas). El término "reactivo cruzado" como se utiliza aquí se utiliza intercambiablemente con el término "específico no-cepa". El

término "antígeno de *N. meningitidis* específico no-cepa inmunogénico" como se utiliza aquí describe un antígeno que puede ser aislado de *N. meningitidis*, aunque también puede ser aislado de otra bacteria (por ejemplo, otras cepas neiseriales, tales como las cepas gonococcales, por ejemplo), o preparadas utilizando tecnología recombinante.

Las proteínas 2086 de la presente invención incluyen proteínas lipidadas y no lipidadas. Además, la presente invención también contempla el uso de las proteínas inmaduras o las preproteínas que corresponden a cada proteína como compuestos/composiciones intermedias.

La presente invención también suministra anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a los agentes inmunogénicos anteriores, de acuerdo a las implementaciones de la invención. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las anteriores. Adicionalmente, la presente invención suministra composiciones y/o composiciones inmunogénicas y su uso para prevenir, tratar y/o diagnosticar meningitis meningococal, en particular la enfermedad meningococal del serogrupo B, así como también los métodos para preparar dichas composiciones.

Las composiciones de la presente invención han mostrado ser altamente inmunogénicas y capaces de elicitar la producción de anticuerpos bactericidas. Estos anticuerpos son reactivos cruzados a cepas meningococales heterólogas serogrupo, serotipo y serosubtipo. De acuerdo con esto, las presentes composiciones solucionan las deficiencias de los intentos de vacuna previos de *N. meningitidis* al exhibir la capacidad de elicitar anticuerpos bactericidas en las cepas neiseriales heterólogas. Así, entre otras ventajas, la presente invención suministra composiciones inmunogénicas que se pueden componer con componentes menores para elicitar protección comparable a los agentes previamente utilizados. Las composiciones o los agentes inmunogénicos allí (por ejemplo, polipéptidos, porciones o fragmentos inmunogénicos, y equivalentes biológicos, etc., sin limitación) se pueden utilizar solos o en combinación con otros antígenos o agentes para elicitar la protección inmunológica de la infección o enfermedad meningococal, así como también elicitar la protección inmune de la infección y/o la enfermedad originada por otros patógenos. Esto simplifica el diseño de una composición inmunogénica para el uso contra la infección meningococal al reducir el número de antígenos requeridos para proteger contra múltiples cepas. De hecho, la proteína 2086 purificada reducirá dramática e inesperadamente el número de proteínas requeridas para suministrar cubrimiento inmunogénico adecuado

de las cepas responsables de la enfermedad meningococal. La proteína 2086 puede ser recombinantemente expresada en *E. coli* como una lipoproteína, que es de la forma tipo silvestre de la proteína, a niveles mucho mayores que los meningococos nativos.

En razón a los anticuerpos dirigidos contra la proteína 2086 de la cepa simple se encontró que matar cepas no relacionadas (es decir, heterólogas), se hizo un intento de caracterizar un gran número de cepas heterólogas por la presencia de un "homólogo 2086", y determinar el nivel de conservación de la secuencia. Aunque aproximadamente el 70% e las cepas ensayadas mediante PCR tuvieron homólogos 2086 que podrían ser amplificados utilizando los cebadores que amplificaron el gen 2086 original de la cepa 8529, el restante aproximadamente 30% fue negativo mediante este ensayo. Este restante aproximadamente 30% se encontró que contenía un homólogo 2086 que tenía solamente aproximadamente 60% de homología de secuencia de aminoácido con el gen 8529 original derivado del 2086. Otros cebadores fueron identificados los cuales podrían amplificar un homólogo 2086 de estas aproximadamente 30% de cepas. Las cepas de *N. meningitidis* ensayadas han sido diseñadas por pertenecer a la subfamilia A o la Subfamilia B dependiendo de que conjunto de cebadores

puede amplificar un homólogo 2086. Los detalles de estos experimentos son subrayados en el Ejemplo 5 adelante.

La presencia de una proteína 2086 en serosubtipos numerosos

Para determinar el nivel de conservación de secuencia del gen 2086 entre las cepas de *N. meningitidis*, varios representantes de las Subfamilias A y B fueron clonados como genes de longitud completa y sometidos a un análisis de secuencia de ADN. Utilizando los cebadores como se describió aquí, ver, por ejemplo, Tabla IV, veinticuatro cepas meningococales del serogrupo B fueron identificadas, las cuales expresan diferentes antígenos de serosubtipo y también expresan una proteína compartida, P2086. Los ejemplos de estas secuencias son suministrados aquí y son mostrados como secuencias de ADN maduro (es decir, todas las secuencias de señal de lipoproteína han sido clivadas en el residuo de cisteína). Ver, por ejemplo, las secuencias de aminoácido de las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares, sin limitación.

Aunque la proteína 2086 no está presente en grandes cantidades en las cepas tipo silvestre, es un objetivo para los anticuerpos bactericidas. Estos anticuerpos, a diferencia

de aquellos producidos en respuesta al PorAs, son capaces de matar cepas que expresan serosubtipos heterólogos.

Los anticuerpos a la proteína 2086 también protegen pasivamente ratas infantes del desafío con meningococo. (ver Tabla VII) La expresión recombinante de la proteína 2086 posibilita el uso de proteína 2086 como una composición inmunogénica para la prevención de la enfermedad meningococal. Todos los candidatos recientes a composición inmunogénica meningococal en ensayos clínicos han sido mezclas complejas o preparaciones de proteína de membrana exterior que contienen muchas diferentes proteínas. La proteína PorA, que suministra especificidad de serosubtipo, requerirá la inclusión de 6 a 9 variantes en una composición inmunogénica para suministrar aproximadamente 70-80% de cubrimiento de los serosubtipos relacionados con la enfermedad. En contraste, se demuestra claramente aquí que el antisuero a una proteína 2086 simple sola es capaz de matar representantes de seis serosubtipos responsables de aproximadamente el 65% de los aislados de la enfermedad en Europa Occidental y en los Estados Unidos. Por lo tanto, la proteína 2086 purificada tiene el potencial de reducir el número de proteínas requeridas para suministrar cubrimiento de la composición inmunogénica adecuada de los serosubtipos responsables de la enfermedad meningococal.

Proteínas, Porciones Inmunogénicas y Equivalentes Biológicos

Las proteínas 2086 suministradas por la presente invención son proteínas aisladas. El término "aisladas" significa alterado por la mano del hombre de un estado natural. Si una composición "aislada" o sustancia ocurre en la naturaleza, esta se ha cambiado o removida de su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polipéptido o un polinucleótido naturalmente presente en el animal viviente no es "aislado", pero el mismo polipéptido o polinucleótido separado de los materiales coexistentes en su estado natural es "aislado", tal como el término se emplea aquí. De acuerdo con esto, como se utiliza aquí, el término "proteína aislada" comprende proteínas aisladas de una fuente natural y proteínas preparadas utilizando tecnología recombinante, así como también tales proteínas cuando se combinan con otros antígenos y/o aditivos, tales como portadores farmacéuticamente aceptables, amortiguadores, adyuvantes, etc., por ejemplo.

Una proteína 2086, la porción inmunogénica de ésta y/o el equivalente biológico de ésta, de acuerdo con una modalidad de la invención, comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

ADIGxGLADA (ID DE SEC NO: 254), en donde x es cualquier aminoácido;

IGxGLADALT (ID DE SEC NO: 255), en donde x es cualquier aminoácido;

SLNTGKLKND (ID DE SEC NO: 256);

SLNTGKLKNDKxSRFDF (ID DE SEC NO: 257, en donde x es cualquier aminoácido);

SGEFQxYKQ (ID DE SEC NO: 258), en donde x es cualquier aminoácido;

IEHLKxPE (ID DE SEC NO: 259), en donde x es cualquier aminoácido; o combinaciones de estos.

Una proteína de la Subfamilia A 2086, una porción inmunogénica de ésta y/o un equivalente biológico de ésta comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las siguientes secuencias de aminoácido, de acuerdo con una modalidad de la presente invención:

GGGVAADIGx (ID DE SEC NO: 260), en donde x es cualquier aminoácido;

SGEFQIYKQ (ID DE SEC NO: 261);

HSAVVALQIE (ID DE SEC NO: 262);

EKINNPDKID (ID DE SEC NO: 263);

SLINQRSFLV (ID DE SEC NO: 264);

SGLGGEHTAF (ID DE SEC NO: 265);

GEHTAFNQLP (ID DE SEC NO: 266);

SFLVSGLGGEH (ID DE SEC NO: 267);

EKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP (ID DE SEC NO: 268);

GKAEYHGKAF (ID DE SEC NO: 269);

YHGKAFSSDD (ID DE SEC NO: 270);

GKAEYHGKAFSSDD (ID DE SEC NO: 271);

IEHLKTPEQN (ID DE SEC NO: 272);

KTPEQNVELA (ID DE SEC NO: 273);

IEHLKTPEQNVELA (ID DE SEC NO: 274);

AELKADEKSH (ID DE SEC NO: 275);

AVILGDTRYG (ID DE SEC NO: 276);

AELKADEKSHAVILGDTRYG (ID DE SEC NO: 277);

EEKGTYHLAL (ID DE SEC NO: 278); o combinaciones de estas.

Un proteína de Subfamilia B 2086, una porción inmunogénica de ésta y/o un equivalente biológico de ésta comprende cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácido, de acuerdo con una modalidad de la presente invención:

LITLESGEFQ (ID DE SEC NO: 279);

SALTALQTEQ (ID DE SEC NO: 280);

FQVYKQSHSA (ID DE SEC NO: 281);

LITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQ (ID DE SEC NO: 282);

IGDIAGEHTS (ID DE SEC NO: 283);

EHTSFDKLPK (ID DE SEC NO: 284);

IGDIAGEHTSFDKLPK (ID DE SEC NO: 285);

ATYRGTAFGS (ID DE SEC NO: 286);

DDAGGKLTYT (ID DE SEC NO: 287);

IDFAAKQGHG (ID DE SEC NO: 288);

KIEHLKSPEL (ID DE SEC NO: 289);

ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNV (ID DE SEC NO: 290);

HAVISGSVLY (ID DE SEC NO: 291);

KGSYSLGIFG (ID DE SEC NO: 292);

VLYNQDEKGS (ID DE SEC NO: 293);

HAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFG (ID DE SEC NO: 294);

AQEVAGSAEV (ID DE SEC NO: 295);

IHHIGLAAKQ (ID DE SEC NO: 296);

VETANGIHHI (ID DE SEC NO: 297);

AQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (ID DE SEC NO: 298); o

VAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (ID DE SEC NO: 299).

La proteína 2086 comprende la siguiente secuencia de consenso y/o las porciones inmunogénicas de ésta de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

Secuencia de Consenso de la Proteína 2086 (ID DE SEC NO: 300):

CSSG-----

GGGVxADIGxGLADALTxPxDxKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQGAE

KTxxxGD---

SLNTGKLKNDKxSRFDFxxxIxVDGxxITLxSGEFQxYKQxHSAxxALQ

XExxxxxxxxxxxxxxRxFxxxxxxGEHTxFxxLPxx-xAxYXGXAFxSDDxxGxLxYx

IDFxxKQGxGxIEHLKxPExNVxLAxxxxKxDEKxHAVIxGxxxYxxxEKGxYxLxxxG

XxAQExAGxAxVxxxxxxHxIxxAxKQ

En la secuencia de consenso anterior, la "x" representa cualquier aminoácido, la región de la posición de aminoácido 5 a la posición de aminoácido 9 es cualquiera de los aminoácidos 0 a 5, la región de la posición del aminoácido 67 a la posición del aminoácido 69 es cualquiera de los aminoácidos 0 a 3, y la posición del aminoácido 156 es cualquiera del aminoácido 0 a 1. La región de la posición del aminoácido 5 a la posición del aminoácido 9 preferiblemente comprende 0, 4 o 5 aminoácidos. La región de la posición del aminoácido 67 a la posición del aminoácido 69 comprende preferiblemente los aminoácidos 0 o 3. Se debe notar particularmente que esta secuencia de consenso ilustra la alta variabilidad de las proteínas 2086. Por vía de teoría,

838

sin intentar estar ligado a ésta, se cree que esta alta variabilidad suministra una reactividad cruzada ventajosa e inesperada.

De acuerdo con una implementación de la presente invención, las proteínas 2086 están caracterizadas por ser inmunogénicas, no patogénicas y no específicas de cepa. Más aún, de acuerdo a una implementación adicional de la presente invención, estas proteínas exhiben inesperadamente inmunogenicidad mientras son aproximadamente 2% a aproximadamente 40% no conservadas.

Como se utiliza aquí, el término "no conservada" se refiere al número de aminoácidos que pueden sufrir inserciones, sustituciones y/o supresiones como un porcentaje del número total de aminoácidos en una proteína. Por ejemplo, si una proteína es 40% no conservada y tiene, por ejemplo, 263 aminoácidos, entonces existen 105 posiciones de aminoácido en la proteína en la cual los aminoácidos pueden sufrir sustitución. De manera similar, si una proteína es no conservada al 10% y tiene, por ejemplo, aproximadamente 280 aminoácidos, entonces existen 28 posiciones de aminoácido en las cuales los aminoácidos pueden sufrir sustitución. Las proteínas 2086 también pueden sufrir supresión de los

residuos aminoácido sin comprometer la inmunogenicidad de las proteínas.

Además, las proteínas 2086 se pueden dividir en subfamilias con base en la homología en varias regiones. Por ejemplo, sin intentar estar limitados a ésta, las secuencias de consenso para dos de tales subfamilias, Subfamilia A y Subfamilia B, se suministran adelante:

Secuencia de Subfamilia A 2086 (ID DE SEC NO: 301)

CSSG----

GGGVAADIGxGLADALTxPxDxKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQGAEK

TxxxGD---

SLNTGKLKNDKxSRFDFxxxIxVDGQxITLxSGEFQIYKQxHSAVVALQI

EKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPxGKAEYHGKAFSSDDxxGxLxYxID

FxxKQGxGxIEHLKTPEQNVELAxAELKADEKSHAVILGDTRYGxEEKGTYHLALxGDR

AQEIAGxATVKIxEKVHEIxIAxKQ

La referencia "x" es cualquier aminoácido.

La región de la posición 5 del aminoácido a la posición 8 del aminoácido es cualquiera de 0 a 4 aminoácidos.

La región de la posición del aminoácido 66 a la posición del aminoácido 68 es cualquiera de 0 a 3 aminoácidos.

La región de la posición del aminoácido 5 a la posición del aminoácido 8 comprende preferiblemente de 0 a 4 aminoácidos. La región de la posición del aminoácido 66 a la posición del aminoácido 68 comprende preferiblemente 0 a 3 aminoácidos.

De acuerdo con una implementación de la presente invención, la proteína 2086 de la Subfamilia A comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

KINNPDKIDSLINQ (ID DE SEC NO: 450);
DEKSHAVILG (ID DE SEC NO: 451);
KIGEKVHEIG (ID DE SEC NO: 452);
Y combinaciones de estas.

De acuerdo con una modalidad adicional de la invención, la proteína 2086 de la Subfamilia A comprende una secuencia de aminoácido que es codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de los polinucleótidos que codifican cualquiera de la ID DE SEC NOS:

450-452. Una persona experta en la técnica sería capaz de identificar y seleccionar los polinucleótidos (es decir, las secuencias de ácido nucleico) que codifican cualquiera de la ID DE SEC NOS: 450-452 y los polinucleótidos que hibridizan bajo condiciones de restricción a cualquiera de los polinucleótidos que codifican cualquiera de las ID DE SEC NOS: 450-452.

Subfamilia B 2086 (ID DE SEC NO 302)

CSSGGGG----

VxADIGxGLADALTAPLHKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQGAE

KTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGxLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQ

XQDxExSxKMVAKRxFxIGDIAGEHTSFDKLPKxxxATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF

AAKQGHGKIEHLKSPELNVxLAxxYIKPDEKxHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGxxA

QEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

La referencia "x" es cualquier aminoácido.

La región de la posición de aminoácido 8 a la posición de aminoácido 12 es cualquiera de 0 a 5 aminoácidos.

La región de la posición de aminoácido 8 a la posición de aminoácido 12 comprende preferiblemente de 0 a 5 aminoácidos.

De acuerdo con una implementación de la presente invención, la proteína 2086 comprende una secuencia de amino seleccionada del grupo que consiste de:

MVAKRQFRIG (ID DE SEC NO: 444);

DIAGEHTSFDKLP (ID DE SEC NO: 445);

YTIDFAAKQG (ID DE SEC NO: 446);

GKIEHLKSPELNV (ID DE SEC NO: 447);

HAVISGSVLYNQ (ID DE SEC NO: 448);

AQEVAGSAEV (ID DE SEC NO: 449);

Y combinaciones de estas.

De acuerdo con una modalidad adicional de la invención, la proteína 2086 de la Subfamilia B comprende una secuencia de aminoácido que es codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones estrictas a cualquiera de los polinucleótidos que codifican una cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-449. Una persona experta en la técnica sería capaz de identificar y seleccionar polinucleótidos (es decir, secuencias de ácido nucleico) que codifican cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-449 y las secuencias de nucleótido que

hibridizan bajo condiciones de restricción a cualquiera de las secuencias de nucleótido que codifican cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-449.

De acuerdo con implementaciones de la presente invención, las Subfamilias de la proteína 2086 pueden ser adicionalmente subdivididas en grupos. Por ejemplo, de acuerdo con una implementación de la presente invención, los siguientes grupos son suministrados: ID DE SEC NO: 2-12 numeradas pares; ID DE SEC NO: 14-24 numeradas pares; ID DE SEC NO: 26-42 numeradas pares; ID DE SEC NO: 50-60 numeradas pares; ID DE SEC NO: 62-108 numeradas pares; ID DE SEC NO: 110-138 numeradas pares; ID DE SEC NO: 140-156 numeradas pares; ID DE SEC NO: 158-174 numeradas pares; y ID DE SEC NO: 224-252 numeradas pares.

Una secuencia de polipéptido de la invención puede ser idéntica a la secuencia de referencia (por ejemplo, las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares o las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares), esto es, 100% idénticas, o se puede incluir un número de alteraciones de aminoácido comparadas con la secuencia de referencia de tal forma que la identidad porcentual es menos del 100%. Tales alteraciones incluyen al menos una supresión, sustitución de aminoácido, que incluyen sustituciones conservadoras y no conservadoras, o

inserciones. Las alteraciones pueden ocurrir en las posiciones amino- o carboxi- terminales de la secuencia de polipéptido de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de aminoácido de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de aminoácido de la referencia.

Así, la invención también suministra proteínas que tienen identidad de secuencia a las secuencias de aminoácido contenidas en el listado de secuencia (es decir, las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares o las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares). Dependiendo de la secuencia particular, el grado de identidad de secuencia es preferiblemente mayor del 60% (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 99,9% o más). Estas proteínas homólogas incluyen mutantes y variantes alélicas.

En las modalidades preferidas de la invención, las proteínas 2086 u otros polipéptidos 2086 (por ejemplo, las porciones inmunológicas y los equivalentes biológicos) generan anticuerpos bactericidas a homólogos y al menos una cepa heteróloga de meningococo. Específicamente, los anticuerpos de los polipéptidos 2086 protegen pasivamente ratas infantes del desafío, tal como intranasal, con meningococo. En

modalidades preferidas adicionales, los polipéptidos 2086 exhiben tal protección para ratas infantes para cepas homólogas y al menos una cepa heteróloga. El polipéptido se puede seleccionar del Resumen de Secuencia anterior, como se estableció en las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares, o el polipéptido puede ser cualquier fragmento inmunológico o equivalente biológico de los polipéptidos listados. Preferiblemente, el polipéptido se selecciona de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares o las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares en el Resumen de Secuencia anterior.

Esta invención también se relaciona con variantes alélicas u otras variantes de los polipéptidos 2086 que son equivalentes biológicos. Los equivalentes biológicos adecuados exhibirán la capacidad de (1) elicitar anticuerpos bactericidas a cepas homólogas y al menos una cepa neiserial heteróloga y/o una cepa gonococcal; (2) reaccionar con la superficie de las cepas homólogas y al menos una cepa neiserial y/o gonococcal heteróloga; (3) conferir protección pasiva contra el desafío vivo; y/o (4) evitar la colonización.

Los equivalentes biológicos adecuados tienen al menos aproximadamente 60%, preferiblemente al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, aún

más preferiblemente aproximadamente 80%, aún más preferiblemente aproximadamente 85%, aún más preferiblemente aproximadamente 90%, aún más preferiblemente 95% o aún más preferiblemente 98%, o aún más preferiblemente 99% de similitud con uno de los polipéptidos 2086 especificados aquí (es decir, las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares), siempre y cuando el equivalente sea capaz de elicitar sustancialmente las mismas propiedades inmunogénicas que una de las proteínas 2086 de esta invención.

Alternativamente, los equivalentes biológicos tienen sustancialmente las mismas propiedades inmunogénicas de una de las proteínas 2086 en las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares. De acuerdo con las modalidades de la presente invención, los equivalentes biológicos tienen las mismas propiedades inmunogénicas que las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares.

Los equivalentes biológicos son obtenidos al generar variantes y modificaciones a las proteínas de esta invención. Estas variantes y modificaciones a las proteínas se obtienen al alterar las secuencias de aminoácido mediante inserción, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos. La

secuencia de aminoácido se modifica, por ejemplo, mediante sustitución con el fin de crear un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas cualidades mejoradas. Unos medios preferidos para introducir alteraciones comprenden hacer mutaciones predeterminadas de la secuencia de ácido nucleico del polipéptido mediante mutagénesis dirigida de sitio.

Las modificaciones y cambios se pueden hacer en la estructura de un polipéptido de la presente invención y obtendrá una molécula que tiene una inmunogenicidad a *N. meningitidis*. Por ejemplo, sin limitación, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos, incluyendo sustitución no conservada y conservada, en una secuencia sin pérdida apreciable de inmunogenicidad. En razón a que esta es la capacidad interactiva y la naturaleza de un polipéptido que define la actividad funcional biológica de los polipéptidos, un número de sustituciones de secuencia de aminoácido se pueden hacer en una secuencia de polipéptido (o, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente) y sin embargo obtener un polipéptido con propiedades similares. La presente invención contempla cualquier cambio a la estructura de los polipéptidos aquí presentes, así como también las secuencias de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos, en donde el polipéptido retiene la inmunogenicidad. Para una persona medianamente versada en la

materia técnica será fácilmente posible modificar los polipéptidos descritos y los polinucleótidos de acuerdo con lo anterior, basados en la guía suministrada allí.

Por ejemplo, ciertas regiones variables han sido identificadas donde la sustitución o la supresión es permisible. La secuencia de consenso 2086, como se discutió previamente, muestra regiones conservadas y no conservadas de la familia 2086 de proteínas de acuerdo con una implementación de la presente invención.

Para hacer tales cambios, cualquier técnica conocida por la persona experta en la técnica se puede utilizar. Por ejemplo, sin pretender estar limitado a ésta, puede ser considerado el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático del aminoácido para conferir función biológica interactiva sobre un polipéptido es generalmente entendida en la técnica. Kyte *et al.* 1982. *J. Mol. Bio.* 157: 105-132.

La sustitución de aminoácidos similares puede ser hecha sobre la base de hidrofilicidad, particularmente donde el polipéptido o péptido equivalente funcional biológico creado de esta manera es destinado a uso en modalidades inmunológicas. La Patente Estadounidense No. 4,554,101,

incorporada aquí como referencia, establece que la hidrofilicidad promedio local mayor de un polipéptido, manejado por la hidrofilicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad, *es decir*, con una propiedad biológica del polipéptido.

Los equivalentes biológicos de un polipéptido pueden ser preparados utilizando mutagénesis específica de sitio. La mutagénesis específica de sitio es una técnica útil en la preparación de polipéptidos de segunda generación, o polipéptidos o péptidos equivalentes biológicamente funcionales, derivados de las secuencias de estos, a través de mutagénesis específica del ADN subyacente. Tales cambios pueden ser deseables cuando son deseables las sustituciones de aminoácido. La técnica suministra adicionalmente una capacidad fácil de preparar y ensayar variantes de secuencia, por ejemplo, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, al introducir uno o más cambios de secuencia de nucleótido en el ADN. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias de oligonucleótido específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como también un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para suministrar una primera secuencia de tamaño suficiente y complejidad de secuencia para formar un dúplex estable a ambos lados de la

unión de supresión que está siendo atravesada. Típicamente, un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud es preferido, con aproximadamente 5 a 10 residuos a ambos lados de la unión de la secuencia que está siendo alterada.

En general, la técnica de mutagénesis específica de sitio es bien conocida en la técnica. Como se apreciará, la técnica típicamente emplea un vector fago que puede existir tanto en forma de hebra simple como de hebra doble. Típicamente, la mutagénesis dirigida de sitio de acuerdo con este se desarrolla al obtener primero un vector de hebra simple que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica toda o una porción de la secuencia de polipéptido de *N. meningitidis* seleccionada. Se prepara un cebador de oligonucleótido que lleva la secuencia mutada deseada (por ejemplo, sintéticamente). Este cebador fue entonces recocido al vector de hebra simple, y extendido mediante el uso de enzimas tales como el fragmento Klenow de polimerasa I de *E. coli*, con el fin de completar la síntesis de la hebra que lleva la mutación. Así, se forma el heterodúplex en donde la hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra lleva la mutación deseada. El vector heterodúplex es luego utilizado para transformar las células apropiadas tales como las células *E. coli* y los clones son seleccionados los cuales incluyen vectores recombinantes que llevan la

mutación. Los kits comercialmente disponibles vienen con todos los reactivos necesarios, excepto los cebadores de oligonucleótido.

Los polipéptidos 2086 incluyen cualquier proteína o polipéptido que comprende similitud de secuencia sustancial y/o equivalencia biológica con la proteína 2086 que tiene una secuencia de aminoácido de una de las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares. Además, un polipéptido 2086 de la invención no está limitado a una fuente particular. Así, la invención suministra la detección general y el aislamiento de los polipéptidos de una variedad de fuentes. También, los polipéptidos 2086 se pueden preparar recombinantemente, tal como es conocido en la técnica, con base en la guía suministrada aquí, o de cualquier otra manera sintética, como se conoce en la técnica.

Se contempla en la presente invención, que un polipéptido 2086 pueda ser ventajosamente clivado en fragmentos para utilizarlo en análisis estructural o funcional ulterior, o en la generación de reactivos tales como los polipéptidos relacionados con el 2086 y los anticuerpos específicos de 2086. Esto se puede lograr al tratar polipéptidos de *N. meningitidis* purificados o no purificados con una peptidasa tal como endoproteinasa glu-C (Boehringer, Indianápolis, IN).

El tratamiento con CNBr es otro método en el cual los fragmentos de péptido se pueden producir de los polipéptidos 2086 de *N. meningitidis*. Las técnicas recombinantes también pueden ser utilizadas para producir fragmentos específicos de la proteína 2086.

"Variante" como el término que se utiliza aquí, es un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia respectivamente, pero retiene las propiedades esenciales. Una variante típica del polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótido de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótido de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácido de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios del nucleótido pueden dar como resultado una sustitución de aminoácido, adiciones, supresiones, fusiones o truncamientos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se discute adelante. Una variante típica del polipéptido difiere en la secuencia de aminoácido de otro polipéptido de referencia. De manera general, las diferencias están limitadas de tal forma que las secuencias del polipéptido de referencia y las variantes son cercanamente similares en total y, en muchas regiones, idénticas (es decir, biológicamente equivalentes). Una variante y polipéptido de referencia pueden diferir en la

secuencia de aminoácido por una o más sustituciones, adiciones, supresiones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede ser o no aquel codificado por un código genético. Una variante de un polipéptido o polinucleótido puede ser de ocurrencia natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no es conocida por ocurrir de manera natural. Las variantes de ocurrencia no natural de los polinucleótidos y polipéptidos pueden ser hechas mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

"Identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptido o dos o más secuencias de polinucleótido, como se determinó al comparar las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre las secuencias de polipéptido o polinucleótido, como puede ser el caso, determinada por la coincidencia entre cuerdas de tales secuencias. "Identidad" y "similitud" se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo pero no estando limitados a aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y

Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. *Applied Math.*, 48: 1073(1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad son designados para dar la más grande coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud son codificados en programas de computador públicamente disponibles. Los métodos de programa de computador preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programa GCG (Devereux, J., *et al* 1984), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S.F., *et al.*, 1990). El programa BLASTX está públicamente disponible de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., *et al.*, 1990). El bien conocido algoritmo Smith Waterman también se puede utilizar para determinar la identidad.

Por vía de ejemplo, sin pretender estar limitado a esta, una secuencia de aminoácido de la presente invención puede ser idéntica a las secuencias de referencia, ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares y ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares; es decir 100% idénticas, o pueden incluir un número de

alteraciones de aminoácido comparadas con la secuencia de referencia de tal forma que la identidad porcentual es menor del 100%. Tales alteraciones son seleccionadas del grupo que consiste de al menos una supresión de aminoácido, sustitución, incluyendo sustituciones conservadoras y no conservadoras, o inserciones, y en donde dichas alteraciones pueden ocurrir en las posiciones amino- o carboxi- terminales de la secuencia de polipéptido de referencia o en cualquier parte entre estas posiciones terminales, entremezclada bien sea individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácido para una identidad porcentual dada se determina al multiplicar el número total de aminoácidos en la ID DE SEC NO: 2-252 numeradas pares y las ID DE SEC NO: 331-443 numeradas impares mediante un porcentaje numérico de la identidad porcentual respectiva (dividida por 100) y luego sustrayendo ese producto de dicho número total de aminoácidos en cualquier ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares y ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares, o:

$$n_a = x_a - (x_a * y),$$

En donde n_a es el número de alteraciones de aminoácido, x_a es el número total de aminoácidos en las ID DE SEC NOS: 2-252

numeradas pares y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares, y y es, por ejemplo 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85% etc., y en donde cualquier producto no entero de x.sub.a y y es redondeado hacia abajo al entero más cercano antes de sustraerlo de x_a.

En las modalidades preferidas el polipéptido anterior se selecciona de las proteínas establecidas en las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares, tales como la forma procesada madura de una proteína 2086. Las proteínas 2086 o equivalentes, etc. pueden ser lipidadas o no lipidadas.

El ORF 2086 es expresable en *E. coli* con la secuencia de señal ORF 2086 nativa. Sin embargo, es deseable encontrar medios para mejorar la expresión de las proteínas. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, la secuencia líder produce una forma lipidada de proteína. Por ejemplo, lo siguiente describe el uso de la secuencia de señal de la proteína P4 de *Haemophilus influenzae* no tipificable para mejorar la expresión.

El procesamiento de las lipoproteínas bacterianas inicia con la síntesis de un precursor de poliproteína que contiene una secuencia de señal, que a su vez contiene un sitio de procesamiento/modificación de lipoproteína consenso. Esta

lipoproteína pasa inicialmente a través de un sistema ID DE SEC NO: común en la membrana interior de la bacteria Gram negativa o sobre la membrana en la bacteria Gram positiva. Una vez ubicada la membrana mediante el sistema ID DE SEC NO:, la prolipoproteína es clivada mediante señal de peptidasa II en el sitio de consenso y el residuo de cisteína N-terminal expuesto es glicerado y acilado. Hayashi et al. 1990. Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* Junio; 22(3): 451-71; Oudega et al. 1993. Las proteínas SecB, SecA, y SecY de *Escherichia coli* son requeridas para la expresión e inserción de membrana de la proteína de liberación de bacteriocina, una lipoproteína pequeña. *J. Bacterial.* Mar; 175(5): 1543-7; Sankaran et al. 1995. Modification of bacterial lipoproteins. *Methods Enzymol.* 250: 683-97.

En las bacterias Gram negativas, el transporte de la proteína lipidada a la membrana exterior es mediada por un sistema transportador ABC único con especificidad de membrana dependiendo de la señal de escogencia en la posición 2 de la lipoproteína. Yakushi et al 2000. Un nuevo transportador ABC media en la separación de las proteínas modificadas de lípido de las membranas. *Nat Cell Biol.* Abril; 2 (4): 212-8.

La fusión con las lipoproteínas bacterianas y sus secuencias de señal han sido utilizadas por exhibir proteínas

recombinantes sobre la superficie de la bacteria. Las Patentes Estadounidenses Nos. 5,583,038 y 6,130,085. El intercambio de secuencias de señal de lipoproteína puede incrementar la producción de la lipoproteína. De et al. 2000. La purificación y caracterización de adhesina A de superficie de neumococo palmitoilatada de *Streptococcus pneumoniae* expresada en *Escherichia coli*. *Vaccine*. Marzo 6; 18(17): 1811-21.

La lipidación bacteriana de las proteínas es conocida por incrementar o moificar la respuesta inmunológica a las proteínas. Erdile et al. 1993. El papel de lípido unido en inmunogenicidad de Borrelia burgdorferi OspA. *Infect. Immun.* Enero; 61(1): 81-90; Snapper et al. 1995. Las lipoproteínas bacterianas pueen sustituir las citocinas en la respuesta inmune humoral a los antígenos tipo II independientes de células T. *J. Immunol.* Dic. 15; 155(12): 5582-9. Sin embargo, la expresión de lipoproteína bacteriana puede ser complicada mediante la restricción del procesamiento. Pollitt et al. 1986. El efecto de las sustituciones de aminoácido en el sitio de clivaje del péptido de señal de la lipoproteína de membrana exterior mayor de *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* Feb 5; 261(4): 1835-7; Lunn et al. 1987. Los efectos de las mutaciones de péptido de señal de prolipoproteína sobre la secreción de prolijo-beta-lactamasa híbrida en *Escherichia*

coli. *J. Biol. Chem.* Jun 15; 262(17): 8318-24; Klein et al. 1988. Las propiedades distintivas de las secuencias de señal de las lipoproteínas bacterianas. *Protein Eng.* Abril; 2(1): 15-20. La expresión de lipoproteína bacteriana también se complica mediante otros problemas tal como la toxicidad o los niveles de baja expresión. Gomez et al. 1994. La lipoproteína Lp1A de *Bacillus subtilis* origina la lisis celular cuando se expresa en *Escherichia coli*. *MIcrobiology*. Agosto; 140 (Pt 8): 1839-45; Hansson et al. 1995. La expresión de las formas truncada y de longitud completa de la proteína A en la superficie exterior de Borrelia de enfermedad Lyme en *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* Feb; 6(1): 15-24; Yakushi et al 1997. Letalidad del enlace covalente entre lipoproteína de membrana exterior mayor localizada erróneamente y el peptidoglican de *Escherichia coli*. *J. Bacterial.* May; 179(9): 2857-62.

La bacteria de *Haemophilus influenzae* no tipificable expresa una lipoproteína designada P4 (también conocida como proteína "e"). La forma recombinante de la proteína P4 es altamente expresada en *E. coli* utilizando una secuencia de señal P4 nativa. Patente Estadounidense No. 5,955,580. Cuando la secuencia de señal P4 nativa es sustituida por la secuencia de señal ORF 2086 nativa en un vector de expresión en *E. coli*, se incrementa el nivel de expresión de ORF2086.

Este concepto de utilizar una secuencia de señal P4 heteróloga para incrementar la expresión es extensible a otras lipoproteínas bacterianas. En particular, el análisis de los genomas bacterianos conduce a la identificación de muchos ORF por ser de posible interés. Los intentos para expresar cada ORF con su secuencia de señal nativa en una célula huésped heteróloga, tal como *E. coli*, ha dado origen a una variedad de problemas inherentes a utilizar una variedad de secuencias de señal, incluyendo estabilidad, compatibilidad y así sucesivamente. Para minimizar estos problemas, la secuencia de señal P4 se utiliza para expresar cada ORF de interés. Como se describió anteriormente, la secuencia de señal P4 mejora la expresión del ORF 2086 heterólogo. Un vector de expresión es construido al suprimir la secuencia de señal nativa del ORF de interés, y ligar la secuencia de señal P4 al ORF. Una célula huésped adecuada es luego transformada, transfectada o infectada con el vector de expresión, y la expresión del ORF se incrementa en comparación con la expresión utilizando la secuencia de señal nativa del ORF.

La forma no lipidada se produce mediante una proteína a la que le falta la secuencia líder original o mediante una secuencia líder que es reemplazada con una porción de

secuencia que no especifica un sitio para acilación de ácido graso en una célula huésped.

Las varias formas de las proteínas 2086 de esta invención son denominadas aquí como proteína "2086", a menos que se específicamente se anote otra cosa. También el "polipéptido 2086" se refiere a las proteínas 2086 así como también las porciones inmunogénicas de los equivalentes biológicos de esta como se anoto anteriormente, a menos que se indique otra cosa.

La proteína 2086 de *N. meningitidis* purificada y aislada de longitud completa tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 28 a 35 kDa medido sobre un gel de poliacrilamida SDS con gradiente de 10% a 20% (SDS-PAGE). Más específicamente, esta proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 26000 a 30000 daltons medido mediante espectrometría de masa.

Preferiblemente, los polipéptidos 2086 y los ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos se utilizan para evitar o mejorar infección causada por *N. meningitidis* y/o otras especies.

Anticuerpos

Las proteínas de la invención, que incluyen la secuencia de aminoácido de las ID DE SEC NOS: 2-252 y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares, sus fragmentos, y análogos de estos, o células que los expresan, también se utilizan como inmunógenos para producir anticuerpos inmunoespecíficos para los polipéptidos de la invención. Esta invención incluye anticuerpos a polipéptidos inmunoespecíficos y el uso de tales anticuerpos para detectar la presencia de *N. meningitidis*, suministrar protección pasiva o medir la cantidad o concentración de polipéptidos en una célula, una célula o extracto de tejido, o un fluido biológico.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos anti-idiotípicos. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados con un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son una población sustancialmente homogénea de anticuerpos a los antígenos específicos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser obtenidos mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256: 495-497 y Patente Estadounidense No. 4,276,110. Tales

anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de estas.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas, porciones diferentes de las cuales son derivados de especies animales diferentes, tales como aquellas que tienen región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murina y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción se conocen en la técnica (Cabilly *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 81: 3273-3277; Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 81: 6851-6855; Boulianne *et al.*, 1984, *Nature* 312: 643-646; Cabilly *et al.*, Solicitud de Patente Europea 125023 (publicada en Noviembre 14, 1984); Taniguchi *et al.*, Solicitud de Patente Europea 171496 (publicada Febrero 19, 1985); Morrison *et al.*, Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada Marzo 5, 1986); Neuberger *et al.*, Solicitud PCT WO 86/01533 (publicada Marzo 13, 1986); Kudo *et al.*, Solicitud de Patente Europea 184187 (publicada Junio 11, 1986); Morrison *et al.*, Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada Marzo 5,1986) ; Sahagan *et al.*, 1986, *J Immunol* 137: 1066-1074; Robinson *et al.*, PCT/US86/02269 (publicada Mayo 7, 1987) ; Liu *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 84: 3439-3443; Sun *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA

84: 214-218; Better *et al.*, 1988, *Science* 240: 1041-1043). Estas referencias se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad.

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con un sitio de unión de antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo anti-Id se prepara al inmunizar un animal de las mismas especies y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) como la fuentes del anticuerpo monoclonal con el anticuerpo monoclonal para el cual está siendo preparado un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante al producir un anticuerpo de estos determinantes isotópicos (el anticuerpo anti-Id).

De acuerdo con esto, los anticuerpos monoclonales generados contra los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar para introducir anticuerpos anti-Id en animales adecuados. Las células de bazo de tales ratones inmunizados pueden ser utilizadas para producir hibridomas anti-Id que secretan anticuerpos monoclonales anti-Id. Además, los anticuerpos anti-Id se pueden acoplar a un portador tal como una hemocianina de lapa de cerradura (KLH) y utilizada para inmunizar ratones BALB/c adicionales. El suero de estos

ratones contendrá anticuerpos anti-anti-Id que tienen las propiedades de unión del mAb final específico para un epítopo R-PTPasa. Los anticuerpos anti-Id tiene así sus epítopos idiotípicos, o "idiotopos" estructuralmente similares al epítopo que está siendo evaluado, tal como los polipéptidos de *Streptococcus pyogenes*.

El término "anticuerpo" también pretende incluir tanto las moléculas intactas así como también los fragmentos tales como el Fab que es capaz de unirse antígeno. Los fragmentos Fab carecen de fragmentos Fc del anticuerpo intacto, limpiado más rápidamente de la circulación, y puede tener menos tejido no específico de unión que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, 1983, *J. Nucl. Med.* 24: 316-325). Se apreciará que el Fab y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden utilizar para la detección y cuantificación de polipéptidos de *N. meningitidis* de acuerdo con los métodos para moléculas de anticuerpo intactas.

Los anticuerpos de esta invención, tal como los anticuerpos anti-idiotípicos" ("anti-Id"), se pueden emplear en un método para el tratamiento o prevención de infección con *Neisseria* en huéspedes mamíferos, que comprende la administración de una cantidad inmunológicamente efectiva de anticuerpo, específica para un polipéptido como se describió

anteriormente. El anticuerpo anti-Id también se puede utilizar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, que produzca un así llaamdo anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original que indujo el anti-Id. Así, al utilizar anticuerpos a los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

Los anticuerpos se utilizan en una variedad de maneras, por ejemplo, para confirmación de que una proteína es expresada, o para confirmar donde es expresada una proteína. El anticuerpo marcado (por ejemplo, marcación fluorescente por FACs) se puede incubar con bacterias intactas y la presencia del marcador sobre la superficie bacterial confirma la localización de la proteína, por ejemplo.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la invención se pueden obtener al administrar los polipéptidos o los fragmentos que llevan epítopos, análogos, o células a un animal que utiliza protocolos de rutina. Para preparar anticuerpos monoclonales, se utiliza cualquier técnica que suministre anticuerpos producidos mediante cultivos de línea celular continua.

Polinucleótidos

Como con las proteínas de la presente invención, un polinucleótido de la presente invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a cualquiera de las secuencias de referencia de las ID DE SEC NOS: 330-342 numeradas pares, que es 100% idéntica, o pueden estar incluidas hasta un número de alteraciones de nucleótido comparadas con la secuencia de referencia. Tales alteraciones son seleccionadas del grupo que consiste de al menos una supresión de nucleótido, sustitución, que incluye transición o transversión, o inserción, y en donde dichas alteraciones pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótido de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más de los grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de nucleótido se determina al multiplicar el número total de nucleótidos en cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares mediante el porcentaje numérico de la identidad porcentual respectiva (dividida por 100) y sustrayendo ese producto de dicho número total de nucleótidos en dicha secuencia.

Por vía de ejemplo, sin pretender estar limitado a esta, el polinucleótido de *N. meningitidis* aislado que comprende una secuencia de polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad con cualquier secuencia de ácido nucleico de las ID DE SEC NOS: 1-253 numeradas impares y las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares; una variante degenerada de ésta o un fragmento de ésta, en donde la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta n_n, alteraciones de ácido nucleico sobre la región polinucleótida completa de la secuencia de ácido nucleico de las ID DE SEC NOS: 1-253 numeradas impares y las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares, en donde n_n es el número máximo de alteraciones y se calcula mediante la fórmula:

$$n_n = x_n - (x_n * y),$$

en la cual x_n es el número total de ácido nucleicos de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 1-253 numeradas impares y las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares y y tiene un valor de 0,70, en donde cualquier producto no entero de x_n y y es redondeado hacia abajo al entero más cercano antes de sustraer tal producto de x_n. Por supuesto, y también puede tener un valor de 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95% etc. Las alteraciones de una secuencia de polinucleótido que codifica los polipéptidos que comprende

las secuencias de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares y las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares pueden crear mutaciones antisentido, sin sentido o con desplazamiento del marco de lectura en esta secuencia de codificación y alterar de esta manera el polipéptido codificado por los polinucleótidos que siguen tales alteraciones.

Ciertas modalidades de la presente invención se relacionan con los polinucleótidos (aquí denominados como "polinucleótidos 2086" o "polinucleótidos ORF2086") que codifican las proteínas 2086 y los anticuerpos hechos contra las proteínas 2086. En las modalidades preferidas, un polinucleótido aislado de la presente invención es un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad con la secuencia de nucleótido escogida de una de las ID DE SEC NOS: 1-253 numeradas impares y las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares, una variante degenerada de estas, o un fragmento de estas. Como se definió aquí, una "variante degenerada" se define como un polinucleótido que difiere de la secuencia de nucleótido mostrada en la ID DE SEC NO: 1 y la ID DE SEC NO: 253 numeradas impares (y fragmentos de estas) debido a la degeneración del código genético, pero aún codificar la misma proteína (por ejemplo, las ID DE SEC NOS:

2-252 numeradas pares y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares) como aquella codificada mediante la secuencia de nucleótido mostrada en las ID DE SEC NOS: 1-253 numeradas impares y las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares.

En otra modalidades, el polinucleótido es un complemento a una secuencia de nucleótido escogida de una de las ID DE SEC NOS: 1-253 numeradas impares y las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares, una variante degenerada de estas, o un fragmento de estas. En aún otras modalidades, el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de ADN , ADN cromosomal, cADN y ARN y puede además comprender nucleótidos heterólogos. En otra modalidad, el polinucleótido aislado hibridiza una secuencia de nucleótido escogida de una de las ID DE SEC NOS: 1-253 y las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares, un complemento de estas, una variante degenerada de estas, o un fragmento de estas, bajo condiciones de hibridización de restricción alta. En aún otras modalidades, el polinucleótido hibriza bajo condiciones de hibridización de restricción intermedia.

Se apreciará que los polinucleótidos 2086 pueden ser obtenidos de fuentes naturales, sintéticas o semi-sintéticas, adicionalmente la secuencia de nucleótido puede ser una secuencia de ocurrencia natural, o puede estar relacionada

mediante mutación, incluyendo sustituciones de base simple o múltiple, supresiones, inserciones, e inversiones, a tal secuencia de ocurrencia natural, siempre y cuando la molécula de ácido nucleico que comprende tal secuencia sea capaz de ser expresada como un polipéptido inmunogénico 2086 como se describió anteriormente. La molécula de ácido nucleico puede ser ARN, ADN, de doble hebra o hebra sencilla, de forma lineal o circular covalentemente cerrada. La secuencia de nucleótido puede tener secuencias de control de expresión ubicadas adyacentes a ésta, tales secuencias de control usualmente son derivadas de una fuente heteróloga. Generalmente, la expresión recombinante de la secuencia de ácido nucleico de esta invención utilizará una secuencia de codón de parada, tal como el TAA, en el extremo de la secuencia de ácido nucleico.

La invención también incluye polinucleótidos capaces de hibridizar bajo condiciones de restricción reducida, más preferiblemente condiciones restringidas, y más preferiblemente condiciones altamente restringidas, a los polinucleótidos descritos aquí. Ejemplos de condiciones de restricción se muestran en la Tabla de Condiciones de Restricción adelante: condiciones altamente restringidas son aquellas que son al menos tan restringidas como, por ejemplo, las condiciones A-F; condiciones restringidas son al menos

tan restringidas como, por ejemplo las condiciones G-L; y las condiciones de restricción reducida son al menos tan restringidas como, por ejemplo, las condiciones M-R.

CONDICIONES DE RESTRICCIÓN - TABLA I

Condición de Restricción	Híbrido de Polinucleótido	Longitud de Híbrido (bp)[I]	Temperatura De Hibridización y Amortiguador[H]	Temperatura de Lavado y Amortiguador[H]
A	ADN:ADN	>50	65EC;1xSSC-o-42EC;1xSSC,50% formamida	65EC; 0,3xSSC
B	ADN:ADN	<50	T_B;1xSSC	T_B;1xSSC
C	ADN:ARN	>50	67EC;1xSSC-o-45EC;1xSSC,50% Formamida	67EC; 0,3xSSC
D	ADN:ARN	<50	T_D;1xSSC	T_D;1xSSC
E	ARN:ARN	>50	70EC;1xSSC-o-50EC;1xSSC,50% Formamida	70EC; 0,3xSSC
F	ARN:ARN	<50	T_F;1xSSC	T_F;1xSSC
G	ADN:ADN	>50	65EC;4xSSC-o-42EC;4xSSC,50% Formamida	65EC; 1xSSC
H	ADN:ADN	<50	T_H;4xSSC	T_H;4xSSC
I	ADN:ARN	>50	67EC;4xSSC-o-45EC;4xSSC,50% Formamida	67EC; 1xSSC
J	ADN:ARN	<50	T_J;4xSSC	T_J;4xSSC
K	ARN:ARN	>50	70EC;4xSSC-o-50EC;4xSSC,50% Formamida	67EC; 1xSSC
L	ARN:ARN	<50	T_L;2xSSC	T_L;2xSSC
M	ADN:ADN	>50	50EC;4xSSC-o-	50EC;

			40EC; 6xSSC, 50% Formamida	2xSSC
N	ADN:ADN	<50	T_N; 6xSSC	T_N; 6xSSC
O	ADN:ARN	>50	55EC; 4xSSC-o-42EC; 6xSSC, 50% Formamida	55EC; 2xSSC
P	ADN:ARN	<50	T_P; 6xSSC	T_P; 6xSSC
Q	ARN:ARN	>50	60EC; 4xSSC-o-45EC; 6xSSC, 50% Formamida	60EC; 2xSSC
R	ARN:ARN	<50	T_R; 4xSSC	T_R; 4xSSC

bp[1]: La longitud del híbrido es aquella anticipada por la o las regiones hibridizadas de los polinucleótidos hibridizantes. Cuando se hibridiza un polinucleótido a un polinucleótido objetivo de secuencia no conocida, la longitud del híbrido se asume por ser aquella del polinucleótido hibridizante. Cuando los polinucleótidos de secuencia conocida son hibridizados, la longitud del híbrido se puede determinar al alinear las secuencias de los polinucleótidos e identificar la región o las regiones de las complementariedades de secuencia óptima.

amortiguador[H]: SSPE (1xSSPE es 0,15M de NaCl, 10 mM de NaH_2PO_4, y 1,25 mM de EDTA, pH 7,4) puede ser sustituido por SSC (1xSSC es 0,15M de NaCl y 15 mM de citrato de sodio) en la hibridización y los amortiguadores de lavado; los lavados

se desarrollan durante 15 minutos después de que se completa la hibridización.

T_B a T_R: La temperatura de hibridización para los híbridos se anticipa que es menos de 50 pares base de longitud debe ser 5-10EC menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para los híbridos menores de 18 pares base de longitud, $T_m(EC)=2(\#\text{ de A + T bases}) + 4(\#\text{ de G + C bases})$. Para los híbridos entre 18 y 49 pares base de longitud, $T_m(EC) = 81,5 + 16,6(\log_{10}[Na^+]) + 0,41(\%G+C) - (600/N)$, donde N es el número de bases en el híbrido, y $[Na^+]$ es la concentración de iones de sodio en el amortiguador de hibridización ($[Na^+]$ para 1xSSC = 0,165 M).

Ejemplos adicionales de condiciones de restricción para la hibridización de polinucleótidos se suministran en Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 y 11, y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F.M. Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6. 4, incorporados aquí como referencia.

275

La invención también suministra polinucleótidos que son totalmente complementarios con estos polinucleótidos y también suministran secuencias antisentido. Las secuencias antisentido de la invención, también denominadas como oligonucleótidos antisentido, incluyen tanto secuencias generadas internamente como administradas externamente que bloquean la expresión de los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención. La secuencias antisentido de la invención comprenden, por ejemplo, aproximadamente 15-20 pares base. Las secuencias antisentido se pueden diseñar, por ejemplo, para inhibir la transcripción al evitar que el promotor se una a una secuencia no traducida corriente arriba o al evitar la traducción de un transcripto que codifica un polipéptido de la invención al evitar que el ribosoma se una.

Los polinucleótidos de la invención se preparan de muchas maneras (por ejemplo, mediante síntesis química, de librerías de ADN, del organismo mismo) y pueden tomar varias formas (por ejemplo, cebadores, sondas, vectores, de hebra sencilla, de hebra doble). El término "polinucleótido" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como aquellos que contienen las estructuras modificadas.

De acuerdo con implementaciones adicionales de la presente invención, los polinucleótidos de la presente invención comprenden librería de ADN, tal como librería de cADN.

Proteínas de Fusión

La presente invención también se relaciona con proteínas de fusión. Una "proteína de fusión" se refiere a una proteína codificada por dos genes o fragmentos no relacionados fusionados de estos. Por ejemplo, las proteínas de fusión que comprenden varias porciones de región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína inmunogénica o parte de ésta, en muchos casos, emplean una región Fc de inmunoglobulina como parte de una proteína de fusión es ventajosa para el uso en terapia y diagnóstico que resulta en, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (ver, por ejemplo, EP 0 232 262 A1). De otra parte, para algunos usos sería deseable ser capaz de suprimir la parte Fc después de que la proteína de fusión ha sido expresada, detectada y purificada. Los polinucleótidos 2086 de la invención se utilizan para la producción recombinante de polipéptido de la presente invención, el polinucleótido puede incluir la secuencia codificante para el polipéptido maduro, en sí mismo, o la secuencia codificante para el polipéptido maduro en marco de lectura con otras secuencias codificantes, tales

como aquellas que codifican una secuencia líder o secretora, una secuencia pre-, o pro- o prepro- proteína, u otras porciones de péptido de fusión. Por ejemplo, una secuencia marcadora que facilita la purificación de un polipéptido 2086 o un polipéptido fusionado se pueden codificar (ver Gentz et *al.*, 1989, incorporado aquí como referencia en su totalidad). Así, se contempla en una implementación de la presente invención la preparación de polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión que permiten la purificación His-tag de los productos de expresión. El polinucleótido también puede contener secuencias no codificante 5' y 3', tal como las secuencias transcritas, no traducidas, señales de empalme y poliadenilación. Tal polipéptido fusionado se puede producir mediante una célula huésped transformada/transfectada o infectada con un ADN recombinante que clona el vehículo como se describe adelante y puede ser subsecuentemente aislada de la célula huésped para suministrar el polipéptido fusionado sustancialmente libre de otras proteínas de célula huésped.

Composiciones Inmunogénicas

Un aspecto de la presente invención suministra composiciones inmunogénicas que comprenden al menos unas proteínas 2086 o un ácido nucleico que codifica dichas proteínas. Lo anterior

tiene la capacidad de (1) elicitar anticuerpos bactericidas a cepas múltiples; (2) reaccionar con la superficie de cepas múltiples; (3) conferir protección pasiva contra un desafío vivo, y/o evitar colonización.

La formulación de cada una de las composiciones inmunogénicas es bien conocida por las personas expertas en este campo. Las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados y/o los diluyentes incluyen cualquiera y todos los solventes convencionales, medios de dispersión, y llenadores, portadores sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacteriales y antifungosos, agentes de retraso isotónico y de absorción, y similares. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también combinaciones de estos. Portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsificación, preservativos o amortiguadores, que mejoran la vida de almacenamiento o la efectividad del anticuerpo. La preparación y el uso de los portadores farmacéuticamente

aceptables son bien conocidos en la técnica. Con excepción de cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso de ésta en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Tales composiciones inmunogénicas se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo, mediante inyección, o subcutáneamente o intramuscularmente, así como también oralmente o intranasalmente. Los métodos para la inmunización intramuscular son descritos por Wolf *et al.*, y por Sedegah *et al.* Otros modos de administración emplean formulaciones orales, formulaciones pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas, por ejemplo, sin limitación. Las formulaciones orales, por ejemplo, incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y similares, sin limitación.

Las composiciones inmunogénicas de al invención pueden incluir uno o más adyuvantes, que incluyen, pero no están limitados a hidróxido de aluminio; fosfato de aluminio; STIMULON™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA); MPL™ (3-O-lípido A monofosforil desacilado; Corixa, Hamilton, MT), 529 (un compuesto de amino alquil glucosalina

fosfato, Corixa, Hamilton, MT), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA); GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, Washington); N-acetil-muramil--L-teronil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado como nor-MDP); N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifos-foriloxi-etilamina) (CGP 19835A, denominado comoMTP-PE); y toxina de cólera. Otros que se pueden utilizar son derivados no tóxicos de toxina de cólera, incluyendo su subunidad A, y/o conjugados o fusiones trabajadas por ingeniería genética del polipéptido *N. meningitidis* con toxina de cólera o su subunidad B ("CTB"), procoleragenoide, polisacáridos fungosos, incluyendo esquizofilan, dipéptido de muramilo, derivados de dipéptido de muramilo ("MDP"), forbol ésteres, la toxina lábil de calor de *E. coli*, saponinas o polímeros de bloque.

En ciertas modalidades preferidas, las proteínas de esta invención son utilizadas en una composición inmunogénica para administración oral que incluye un adyuvante de mucosa y son utilizadas para el tratamiento o prevención de infección con *N. meningitidis* en un huésped humano. El adyuvante de mucosa puede ser una toxina de cólera; sin embargo, preferiblemente, los adyuvantes de mucosa diferentes de la toxina de cólera que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención

incluyen derivados no tóxicos de una oleotoxina de cólera, en donde la subunidad A es una toxina cólera químicamente modificada mutagenizada, o proteínas relacionadas producidas mediante la modificación de la secuencia de aminoácido de la toxina de cólera. Para una toxina de cólera específica que pueda ser particularmente útil para preparar composiciones inmunogénicas de esta invención, ver la holotoxina de cólera mutante E29H, como se describió en la Solicitud Internacional Publicada WO 00/18434, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Estas se pueden agregar a, o conjugar con, los polipéptidos de esta invención. Las mismas técnicas pueden ser aplicadas a otras moléculas con adyuvante de mucosa o propiedades de suministro tales como la toxina lábil (LT) al calor de *Escherichia coli*. Otros compuestos con adyuvante de mucosa o actividad de suministro se pueden utilizar tal como la bilis; policationes tales como DEAE-dextran y poliornitina; detergentes tales como dodecil benceno sulfato de sodio; materiales lípido-conjugados; antibióticos tales como estreptomicina; vitamina A; y otros compuestos que alteran la integridad estructural o funcional de las superficies de la mucosa. Otros compuestos mucosalmente activos incluyen derivados de estructuras microbianas tales como MDP; acridina y cimetidina. STIMULON™ QS-21, MPL, e IL-12, como se describió anteriormente, también se pueden utilizar.

Las composiciones inmunogénicas de esta invención se pueden suministrar en la forma de ISCOMS (complejos estimulantes inmunes), ISCOMS que contengan CTB, liposomas o encapsulados en compuestos tales como acrilatos o poli(DL-lacturo-co-glicósido) para formar microesferas de un tamaño adecuado para absorción. Las proteínas de esta invención también se opueden incorporar en emulsiones aceitosas.

Antígenos Múltiples

Los agentes inmunogénicos, que incluyen proteínas, polinucleótidos y equivalentes de la presente invención se pueden administrar como el inmunógeno activo solo en una composición inmunogénica, o alternativamente, la composición puede incluir otros inmunógenos activos, que incluyen otros polipéptidos inmunogénicos de *Neisseria sp.*, o proteínas inmunológicamente activas de uno o más de otros patógenos microbianos (por ejemplo, virus, priones, bacterias u hongos, sin limitación) o polisacáridos capsulares. Las composiciones pueden comprender una o más proteínas deseadas, fragmentos o compuestos farmacéuticos, como se desee para una indicación escogida. De la misma manera, las composiciones de esta invención que emplean uno o más ácidos nucleicos en la composición inmunogénica también pueden incluir ácidos

nucleicos que codifican los mismos grupos diversos de proteínas, como se anotó anteriormente.

Cualquier composición inmunogénica multi-antígeno o multi-valente se contempla en la presente invención. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden comprender combinaciones de dos o más proteínas 2086, una combinación de proteína 2086 con una o más de las proteínas PorA, una combinación de proteína 2086 con los polisacáridos del serogrupo de meningococo A, C, Y y W135 y/o conjugados de polisacárido, una combinación de la proteína 2086 con combinaciones de meningococo y neumococo, o una combinación de cualquiera de las anteriores en una forma adecuada para suministrro de mucosa. Las personas expertas en la técnica serían capaces fácilmente de formular tales composiciones inmunológicas multi-antígeno o multi-valentes.

La presente invención también contempla regímenes multi-inmunización en donde cualquier composición útil contra un patógeno se puede combinar allí o con las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, sin limitación, a un paciente le puede ser administrada la composición inmunogénica de la presente invención y otra composición inmunológica para inmunizar contra *S. pneumoniae*, como parte del régimen multi-inmunización. La persona experta en la

técnica sería capaz de seleccionar las composiciones inmunogénicas para uso en conjunto con las composiciones inmunogénicas de la presente invención para los propósitos de desarrollar e implementar regímenes multi-inmunización.

Las modalidades específicas de esta invención se relacionan con el uso de uno o más polipéptidos de esta invención, o ácidos nucleicos que codifican tales, en una composición o como parte de un régimen de tratamiento para evitar o mejorar la infección de *S. pneumoniae*. Uno puede combinar los polipéptidos 2086 o los polinucleótidos 2086 con cualquier composición inmunogénica para uso contra infección de *S. pneumoniae*. Uno también puede combinar los polipéptidos 2086 o los polinucleótidos 2086 con cualquier otra proteína o vacuna meningococal basada en polisacárido.

Los polipéptidos 2086, los fragmentos y los equivalentes se pueden utilizar como parte de una composición inmunogénica de conjugado; en donde una o más proteínas o polipéptidos son conjugados a un portador con el fin de generar una composición que tenga propiedades inmunogénicas contra varios serotipos y/o contra varias enfermedades. Alternativamente, uno de los polipéptidos 2086 se puede utilizar como una proteína portadora para otros polipéptidos inmunogénicos.

La presente invención también se relaciona con un método para inducir respuestas inmunes en un mamífero que comprende la etapa de suministrar a dicho mamífero una composición inmunogénica de esta invención. La composición inmunogénica es una composición que es antigénica en el animal o humano tratado de tal forma que la cantidad inmunológicamente efectiva del o los polipéptidos contenidos en tal composición lleva la respuesta inmune deseada contra la infección de *N. meningitidis*. Las modalidades preferidas relacionan un método para el tratamiento, incluyendo mejoramiento, o prevención de infección de *N. meningitidis* en un humano que comprende administrar al humano una cantidad inmunológicamente efectiva de la composición.

La frase "cantidad inmunológicamente efectiva", como se utiliza aquí, se refiere a la administración de esa cantidad a un huésped mamífero (preferiblemente humano), o en dosis simple o como parte de una serie de dosis, suficiente para al menos originar que el sistema inmune del individuo tratado genere una respuesta que reduzca el impacto clínico de la infección bacteriana. Este puede variar desde una disminución mínima en el ataque bacteriano hasta la prevención de la infección. Idealmente, el individuo tratado no exhibirá la mayoría de las manifestaciones clínicas serias de la infección bacteriana. La cantidad de dosis puede variar

dependiendo de las condiciones específicas del individuo. Esta cantidad se puede determinar en ensayos de rutina o de otra manera por medios conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Otro aspecto específico de la presente invención se relaciona con el uso como la composición inmunogénica de un vector o plásmido que expresa una proteína de esta invención, o una porción inmunogénica de ésta. De acuerdo con esto, un aspecto adicional de esta invención suministra un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero, que comprende suministrar al mamífero un vector o plásmido que expresa al menos un polipéptido 2086 aislado. La proteína de la presente invención se puede suministrar a un mamífero que utiliza un vector vivo, en particular una bacteria recombinante viva, virus u otros agentes vivos, que contengan el material genético necesario para la expresión del polipéptido o la porción inmunogénica del polipéptido extraño.

De acuerdo con una implementación adicional de la presente invención, se suministra un método para diagnosticar meningitis bacterial en un mamífero que comprende: detectar la presencia de los complejos inmunes en un mamífero o una muestra de tejido de dicho mamífero, dicho mamífero o muestra de tejido es puesta en contacto con una composición de

anticuerpo que comprende anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente con al menos un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 2-252 numeradas pares y las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas aleatoriamente; en donde el mamífero o la muestra de tejido es puesta en contacto con la composición de anticuerpo bajo condiciones adecuadas para la formación de los complejos inmunes.

Vectores Virales y No Virales

Los vectores preferidos, particularmente para ensayos particulares *in vitro* e *in vivo*, son vectores virales, tales como lentivirus, retrovirus, virus de herpes, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de vaccinia, baculovirus, y otros virus recombinantes con tropismo celular deseable. Así, un ácido nucleico que codifica una proteína 2086 o el fragmento inmunogénico de ésta se puede introducir *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro* utilizando un vector viral o a través de introducción directa de ADN. La expresión en los tejidos objetivo se puede efectuar al apuntar el vector transgénico a las células específicas, tal como con un vector viral o un ligando receptor, o al utilizar un promotor específico de tejido, o ambos. El suministrote gen objetivo es descrito en

la Publicación PCT No. WO 95/28494, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Los vectores virales comúnmente utilizados para apuntamiento *in vivo o ex vivo* y procedimientos de terapia son vectores basados en ADN y vectores retrovirales. Los métodos para construir y utilizar los vectores virales se conocen en la técnica (por ejemplo, Millar y Rosean, *BioTechniques*, 1992, 7: 980-990). Preferiblemente, los vectores virales son defectuosos en replicación, esto es, son incapaces de replicarse autónomamente en la célula objetivo. Preferiblemente, el virus de replicación defectuosa es un virus mínimo, es decir, retiene solamente las secuencias de su genoma que son necesarias para encapsular el genoma para producir partículas virales.

Los vectores virales de ADN incluyen un virus ADN atenuado o defectuoso, tal como pero no limitado a virus de herpes simples (HSV), papilomavirus, virus de Epstein Barr (EBV), adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), y similares. Los virus defectuosos, a los que les faltan completamente o casi completamente los genes virales, son los preferidos. Los virus defectuosos no son inefectivos después de introducción en una célula. El uso de vectores virales defectuosos permite la administración a las células en área específica

localizada, sin preocupación de que el vector se pueda infectar a otras células. Así, un tejido específico puede ser específicamente apuntado. Ejemplos de vectores particulares incluyen, pero no están limitados a, un vector de virus de herpes defectuoso 1 (HSV1) (Kaplitt *et al.*, *Molec. Cell. Neurosci.*, 1991, 2: 320-330), el vector de virus herpes defectuoso al que le falta un gen de ~~gírico~~-proteína L, u otros vectores de virus herpes defectuosos (Publicación PCT Nos. WO 94/21807 y WO 92/05263); un vector de adenovirus atenuado, tal como el vector descrito en Stratford-Perricaudet *et al.* (*J. Clin. Invest.*, 1992, 90: 626-630; ver también La Salle *et al.*, *Science*, 1993, 259: 988-990); y un vector de virus adeno-asociado defectuoso (Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 1987, 61: 3096-3101; Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 1989, 63: 3822-3828; Lebkowski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8: 3988-3996), cada uno de los cuales se incorpora como referencia aquí en su totalidad.

Varias compañías producen vectores virales comercialmente, incluyendo pero no estando limitados a, Avigen, Inc. (Alameda, CA; vectores AAV), Cell Genesys (Foster City, CA; vectores retrovirales, adenovirales, AAV, y lentivirales), Clontech (vectores retrovirales y baculovirales), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; vectores adenovirales y AAV), Genvec (vectores adenovirales), IntroGene (Leiden, Netherlands;

vectores adenovirales), Medicina Molecular (vectores retrovirales, adenovirales, AAV, y virales de herpes), Norgen (vectores adenovirales), Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido; vectores lentivirales), y Transgene (Estrasburgo, Francia; vectores adenovirales, vaccinia, retrovirales, y lentivirales), incorporados como referencia aquí en su totalidad.

Vectores de Adenovirus. Los adenovirus son virus de ADN eucariótico que se pueden modificar para suministrar eficientemente un ácido nucleico de esta invención a una variedad de tipos de célula. Existen varios serotipos de adenovirus. De estos serotipos, se le da preferencia, dentro del alcance de la presente invención, a utilizar los adenovirus humanos tipo 2 o tipo 5 (Ad 2 o Ad 5) o adenovirus de origen animal (ver Publicación PCT No. WO 94/26914). Aquellos adenovirus de origen animal que se pueden utilizar dentro del alcance de la presente invención incluyen adenovirus de origen canino, bovino, murino (por ejemplo: Mav1, Beard et al., Virology, 1990, 75-81), ovino, porcino, aviar, y de simio (por ejemplo: SAV). Preferiblemente, los adenovirus de origen animal son adenovirus caninos, más preferiblemente un adenovirus CAV2 (por ejemplo, Maniatan o la cepa A26/61, ATCC VR-800, por ejemplo). Varios vectores de adenovirus defectuosos en replicación y de adenovirus mínimos

han sido descritos (Publicaciones PCT Nos. WO 94/26914, WO 95/02697, WO 94/28938, WO 94/28152, WO 94/12649, WO 95/02697, WO 96/22378). Los adenovirus recombinantes defectuosos en replicación de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante cualquier técnica conocida por una persona experta en la técnica (Levrero *et al., Gene,* 1991, 101: 195; Publicación Europea No. EP 185 573; Graham, EMBO J., 1984, 3: 2917; Graham *et al., J; Gen. Virol.,* 1977, 36: 59). Los adenovirus recombinantes son recuperados y purificados utilizando técnicas biológicas moleculares estándar, que son bien conocidas por personas expertas en la técnica.

Virus Adeno-Asociados. Los virus adeno-asociados (AAV) son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que pueden integrarse, de una manera estable y específica de sitio, en el genoma de las células que ellos infectan. Ellos son capaces de infectar un amplio espectrote células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, la morfología o la diferenciación, y ellos no parecen estar involucrados en patologías humanas. El genoma AAV se ha clonado, secuenciado y caracterizado. El uso de los vectores derivados de los AAV para transferir genes *in vitro e in vivo* se ha descrito (ver, Publicación PCT Nos. WO 91/18088 y WO 93/09239; Patente Estadounidense Nos. 4,797,368 y 5,139,941; Publicación Europea No. EP 488 528). Los AAV recombinantes defectuosos en

vectores retrovirales recombinantes, los genes *gag, pol* y *env*

son generalmente suprimidos, en todo o en parte, y reemplazados con una secuencia de ácido nucleico heteróloga de interés. Estos vectores se pueden construir de diferentes tipos de retrovirus, tales como, HIV, MoMuLV ("virus de leucemia Monoley murino" MSV ("virus de sarcoma Molones murino"), HaSV ("virus de sarcoma Harvey"); SNV ("virus de necrosis de bazo"); RSV ("virus de sarcoma Rous") y virus Friend. Las líneas celulares de empaque adecuadas han sido descritas en la técnica anterior, en particular la línea celular PA317 (Patente Estadounidense No. 4,861,719); la línea celular PsiCRIP (Publicación PCT No. WO 90/02806) y la línea celular GP+envAm-12 (Publicación PCT No. WO 89/07150). Además, los vectores retrovirales recombinantes pueden contener modificaciones dentro del LTR para suprimir la actividad transcripcional así como también secuencias de encapsidación extensivas que pueden incluir una parte del gen gag (Bender *et al., J. Virol.*, 1987, 61: 1639). Los vectores retrovirales recombinantes se pueden purificar mediante técnicas estándar conocidas por aquellos medianamente versados en la materia.

Los vectores retrovirales se pueden construir para funcionar como partículas infecciosas o para sufrir una ronda simple de transfección. En el caso anterior, el virus se modifica para retener todos sus genes excepto aquellos responsables por las

líneas celulares de empaque lentiviral están disponibles y son conocidas generalmente en la técnica. Ellas facilitan la producción de vectores de lentivirus de alto título para terapia génica. Como ejemplo es una línea celular de empaque de lentivirus seudotipificada VSV-G inducible con tetraciclina que puede generar partículas de virus en títulos mayores de 106 IU/mL durante al menos 3 a 4 días (Kafri, *et al., J. Virol.*, 1999, 73: 576-584). El vector producido por una línea celular inducible se puede concentrar según sea necesario para transducir eficientemente células no divididas *in vitro* e *in vivo*.

Vectores No Virales. En otra implementación de la presente invención, el vector puede ser introducido in vivo mediante lipofección, como ADN desnudo, o con otros agentes que faciliten la transfección (péptidos, polímeros, etc.). Los lípidos catiónicos sintéticos se pueden utilizar para preparar liposomas para transfección in vivo de un gen que codifique un marcador (Felgner, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84: 7413-7417; Felgner y Ringold, Science, 1989, 337: 387-388; ver Mackey, *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A., 1988, 85: 8027-8031; Ulmer *et al., Science*, 1993, 259: 1745-1748). Los compuestos lípidos útiles y las composiciones para transferir los ácidos nucleicos son descritos en las Publicaciones de Patente PCT Nos. WO

95/18863 y WO 96/17823, y en la Patente Estadounidense No. 5,459,127. Los lípidos pueden ser químicamente acoplados a otras moléculas con el propósito de apuntamiento (ver Mackey, *et al., supra*). Los péptidos de apuntamiento, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas podrían ser acoplados a los liposomas químicamente.

Otras moléculas también son útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (por ejemplo, Publicación de Patente PCT No. WO 95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión de ADN (por ejemplo, Publicación de Patente PCT No. WO 96/25508), o polímero catiónico (por ejemplo, Publicación de Patente PCT No. WO 95/21931).

También es posible introducir el vector in vivo como un plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudos para propósitos de vacuna o terapia génica se pueden introducir en las células huéspedes deseadas mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, electroporación, microinyección, fusión de célula, DEAE dextran, precipitación de fosfato de calcio, uso de una pistola de gen, o el uso de un transportador de vector de ADN (por ejemplo, Wu *et al., J. Biol. Chem.*, 1992, 267: 963-967; Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*,

1988, 263: 14621-14624; Solicitud de Patente Canadiense No. 2,012,311; Williams *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1991, 88: 2726-2730). Las aproximaciones del suministro de ADN mediado por receptor también se pueden utilizar (Curiel *et al., Hum. Gene Ther.*, 1992, 3: 147-154; Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262: 4429-4432). Las Patentes Estadounidenses Nos. 5,580,859 y 5,589,466 describen el suministro de secuencias de ADN exógeno, libres de agentes que faciliten la transfección, en un mamífero. Recientemente, una técnica de transferencia de ADN *in vivo* de alta eficiencia con voltaje relativamente bajo, denominado electrotransferencia, se ha descrito (Mir *et al.*, C.P. *Acad. Sci.*, 1988, 321: 893; Publicación PCT Nos. WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175). De acuerdo con esto, las modalidades adicionales de la presente invención se relacionan con un método para inducir una respuesta inmune en un humano que comprende administrar a dicho humano una cantidad de una molécula de ADN que codifica un polipéptido 2086 de esta invención, opcionalmente con un agente que facilita la transfección, donde dicho polipéptido, cuando se expresa, retiene inmunogenicidad y, cuando se incorpora en una composición inmunogénica y se administra a un humano, suministra protección sin inducir enfermedad mejorada luego de la infección subsecuente del humano con el patógeno *Neisseria sp.*, tal como *N. meningitidis*. Los agentes que facilitan la transfección se conocen en la técnica e

incluyen bupivicaína, y otros anestésicos locales (por ejemplo ver Patente Estadounidense No. 5,739,118) y poliaminas catiónicas (como se publicó en la Solicitud de Patente Internacional WO 96/10038), que se incorpora aquí como referencia.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo, que puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, específico para los polipéptidos 2086 como se describió anteriormente. Tales anticuerpos se pueden producir mediante métodos que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Plásmidos y Sistemas de Expresión Bacterial

Esta invención también suministra una molécula de ADN recombinante, tal como un vector plásmido, que comprende una secuencia de control de expresión que tiene secuencias promotoras y secuencias cebadoras y una secuencia de nucleótido que codifica para un polipéptido de esta invención, la secuencia de nucleótido se localizada en 3' a la secuencia promotora cebadora. En aún otro aspecto, la invención suministra un vehículo de clonación de ADN recombinante capaz de expresar un polipéptido 2086 que comprende una secuencia de control de expresión que tiene

secuencias promotoras y secuencias cebadoras, y una secuencia de nucleótido que codifica para un polipéptido 2086, estando la secuencia de nucleótido localizada en 3' a las secuencias promotora y cebadora. En un aspecto adicional, se suministra una célula huésped que contiene un ADN recombinante que clona la molécula de vehículo y/o un ADN recombinante como se describió anteriormente. Las secuencias de control de expresión adecuadas y las combinaciones de vehículo de clonación/célula huésped son bien conocidas en la técnica, y son descritos por vía de ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989).

Una vez que los vehículos de clonación de ADN recombinante y/o las células huésped que expresan un polipéptido deseado *a* de esta invención han sido construidas al transformar, transfectar o infectar tales vehículos de clonación o células huésped con plásmidos que contienen los correspondientes polinucleótidos 2086, clonar vehículos o células huésped son cultivadas bajo condiciones tales que se expresan los polipéptidos. El polipéptido luego se aisla sustancialmente libre de componentes de célula huésped contaminantes mediante técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar las modalidades preferidas de la invención. Se debe apreciar por aquellos expertos en la técnica que las técnicas descritas en

los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y así se puedan considerar que constituyan los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica, deben, en vista de la presente descripción, apreciar que muchos cambios se pueden hacer en las modalidades específicas que están descritas y aún obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Identificación de extracto de proteína de membrana neiserial capaz de elicitar anticuerpos bactericidas contra cepas heterólogas:

Con referencia a la Tabla II de adelante, las preparaciones de proteína de membrana exterior vaciada de LOS han mostrado elicitar anticuerpos bactericidas. Estos anticuerpos son a menudo dirigidos hacia el PorA de la cepa respectiva. Las preparaciones de membrana exterior vaciadas de LOS de las cepas meningococales del serogrupo B 8529 (B:15:P1.7b,3) son inusuales de esta manera porque ellos elicitan

inesperadamente anticuerpos bactericidas a varias cepas heterólogas.

TABLA II

Actividad BC de Anti-sOMPS Contra Cepas Diferentes de *N. meningitidis*

Antisuero Semana 6	H44/76	5315	H355	M982	880049	8529*	NMB
Serosubtipo	P1.7,16	P1.5	P1.15	P1.9	P1.4	P1.3	P1.5,2
sOMPs H44/76 25µg QS-21 20µg	1000	<50	<50	<50	<50	980	<50
sOMPs 5315 25µg QS-21 20µg	50	<50	<50	<50	<50	2170	<50
sOMPs H355 25µg QS-21 20µg	<50	<50	450	<50	<50	860	<50
sOMPs M982 25µg QS-21 20µg	92	<50	<50	300	<50	1100	<50
sOMPs 880049 25µg QS-21 20µg	50	<50	<50	<50	<50	1190	<50
sOMPs 8529 25µg QS-21 20µg	1000	<50	450	50	215	>4050 (81,7)	<50
sOMPs 2996 25µg QS-21 20µg	<50	<50	<50	<50	<50	790	148
Suero control célula completa 25µg 3DMPL 25µg	450	50	100	500	150	>1350 (66,0)	952

Para facilitar el aislamiento y la caracterización del o los antígenos responsables para elicitar los anticuerpos bactericidas heterólogos, buscamos identificar que detergente extrajo óptimamente el o los antígenos.

302

Condiciones de Cultivo y Cepas

La cepa 8529 de *N. meningitidis* proveniente de un frasco congelado fue mantenida en un plato GC. (La cepa 8529 meningococal se recibió del RIVM, Bilthoven, Holanda). El plato se incubó a 36° C/5%CO_2 durante 7,5 h. Se utilizaron varias colonias para inocular un recipiente que contenía 50 mL de medio Frantz modificado + suplemento GC. El recipiente se incubó en un agitador de aire a 36° C y se agitó a 200 RPM durante 4,5 h. Se utilizaron 5 mL para inocular un recipiente Fernbach que contiene 450 mL de medio Frantz modificado + suplemento GC. El recipiente se incubó en un agitador de aire a 36° C y se agitó a 100 RPM durante 11h. Los 450 mL completos se utilizaron para inocular 8,5 L de medio Frantz modificado + suplemento GC en un fermentador de 10 L.

Composición del Medio Frantz Modificado

Ácido glutámico	1,3 g/L
Cisteína	0,02
Fosfato de sodio, dibásico, 7 hidrato	10
Cloruro de potasio	0,09
Cloruro de sodio	6
Cloruro de amonio	1,25

Extracto de levadura dializada (YE) 40 ml

(25% de solución YE dializada contra 5 volúmenes de dH_2O durante la noche, luego sometida a autoclave)

Suplemento GC 100X, filtro esterilizado

Dextrosa	400 g/L
Ácido glutámico	10
Cocarboxilasa	0,02
Nitrato férrico	0,5

Los siguientes parámetros fueron controlados durante la fermentación: Temperatura = 36° C; pH = 7,4; Oxígeno Disuelto = 20%. Varias gotas de antiespuma P-2000 fueron agregadas para controlar la espumación. El cultivo creció hasta fase estacionaria. Las células fueron cosechadas mediante centrifugación a OD650=5,25. Un total de 100-300 gramos de la pasta celular húmeda es típicamente cosechado de ~8,5 L de cultivo.

Purificación parcial de las fracciones de proteína de membrana exterior provenientes de meningococo que elicitan anticuerpos bactericidas heterólogos:

100 gms de peso húmedo de células fueron suspendidos, a un volumen de cinco veces el peso húmedo, con 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,4, 1 mM de Na2EDTA y lisado al pasar a través de un equipo microfluidizador 110Y con una cámara a ~18000 psi. El lisado de célula fue clarificado y la cubierta de célula aislada mediante centrifugación a 300000 x g durante 1 hora a 10° C. La cubierta de la célula fue lavada 2X con el mismo amortiguador mediante suspensión con un homogenizador seguido por centrifugación como se hizo anteriormente. Las cubiertas de célula fueron entonces extraídas con 320 mL de 1% (p/v) de Triton X-100 en 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,4, 1 mM de $MgCl_2$. Con referencia a la Tabla 3 de adelante, los resultados de la extracción de detergente diferencial secuencial que utiliza Triton X-100 y Zwittergent 3-14 seguido por inmunización de ratón, nos permitieron determinar que los extractos de Triton extrajeron óptimamente el o los candidatos de interés. Este extracto de Triton X-100, que elicita respuesta de anticuerpo bactericida contra 4 de cinco cepas listadas en la Tabla III, fue entonces fraccionado mediante enfoque isoeléctrico preparativo (IEF) en una unidad BioRad Rotophor. Las concentraciones de amfolito fueron 1% pH 3-10 mezcladas con 1% pH 4-6. Como se muestra en la Tabla III, varias fracciones fueron encontradas por elicitar una respuesta bactericida heteróloga. Las fracciones obtenidas de IEF, que se enfocaron en el rango de pH de 5,5-7,8, elicitaron una respuesta

heteróloga en la mayoría de las cepas según se determinó por ensayo bactericida. Las fracciones IEF agrupadas fueron concentradas y los amfolitos removidos mediante precipitación de etanol. Una purificación adicional se logró al adsorber algunas de las proteínas obtenidas en el rango de pH de aproximadamente 5,5-7,8 sobre una columna de intercambio de anión y comparar la actividad bactericida obtenida después de inmunizar ratones con las proteínas adsorbidas y no adsorbidas. Con referencia de nuevo a la Tabla II, aunque muchas proteínas fueron adsorbidas a la resina de intercambio de anión, las proteínas que no fueron adsorbidas por la columna elicitaron más anticuerpos bactericidas heterólogos.

TABLA III

		Cepa Objetivo BC_{50}				
Método	Fracción	H44/76	880049	H355	539*	M982
LOS-agotado	sOMPs	1000	215	450	NC	50
Detergente Extracciones	Extracto Citoplásmico	200	NT	NT	NT	NT
	TX-100	>800	>800	>800	>800	<25
	Zwittergente 3-12	400	>25	100	400	<25
	Zwittergente 3-14	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14+NaCl	<25	NT	NT	NT	NT
	Sarcosil	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14+calor	<25	NT	NT	NT	NT
Preparativo IEF	Fracciones 1-3 (pH 2,3-3,9)	50	NT	NT	NT	NT
	Fracción 4 (pH 4,1)	>800	<25	100	<25	NT

	Fracción 5 (pH 4,3)	>800	<25	100	200	NT
	Fracción 6 (pH 4,5)	400	NT	NT	NT	NT
	Fracción 7 (pH 4,8)	<25	NT	NT	NT	NT
	Fracciones 8-9 (pH 5,0-5,3)	<25	NT	NT	NT	NT
	Fracciones 10-17 (pH 5,5-7,8)	>800	200	<800	<800	NT
Intercambio de Anión	Adsorbido	400	NT	100	100	NT
	No adsorbido	>6400	NT	<800	<800	NT

NT: no ensayado

*El aislado 539 clínico es una cepa homóloga a 8529, aislado del mismo foco.

Como se muestra en la FIG. 1A, dos proteínas mayores estuvieron presentes en la fracción no adsorbida como se determinó por SDS-PAGE. Para identificar estas proteínas, se desarrollaron dos tipos de análisis. Un análisis fue desarrollar la degradación proteolítica limitada (ver FIG. 1A, y FIG. 1B) seguido por aislamiento y secuenciación de proteína directa. El otro análisis fue desarrollar el SDS-PAGE seguido por excisión de gel, dgestión proteolítica, y LC-MS/MS (Espectrometría de Masa en tándem con Cromatografía Líquida), (ver FIG. 3) para obtener información de espectro de masa en los componentes de las preparaciones de interés. (Ver métodos de secuenciación y mapeo de péptido descrito después en esta sección).

Se analizó la secuencia genómica A. Sanger de *N. meningitidis* utilizando los métodos y algoritmos descritos en Zagursky y Russell, 2001, *BioTechniques*, 31: 636-659. Este análisis mineral produjo más de 12000 Marcos de Lectura Abierta (ORF) posibles). Los datos de secuencia directa y los datos de espectro de masa descritos anteriormente indican que los componentes mayores de la fracción no adsorbida fueron los productos de varios ORF presentes en un análisis de base de datos Sanger. Las tres proteínas predominantes identificadas por esta metodología corresponden a ORF 4431, 5163 y 2086, (ver FIG. 1B y 3).

Aunque el ORF 4431 fue la proteína predominante más identificada en las fracciones, los anticuerpos de ratón para 4431 lipidado recombinante no fueron bactericidas y no suministraron una respuesta protectora en un modelo animal. Análisis adicional del ORF 5163 está en progreso.

El segundo componente más predominante de las preparaciones descritas aquí corresponde al producto de ORF 2086.

Métodos de Inmunogenicidad:

Preparación de antisuero:

Excepto donde se anote, las vacunas/composiciones de proteína se formularon con 25 µg de proteína total y se adyuvaron con 20 µg de QS-21. Se administró una dosis de 0,2 mL mediante inyección subcutánea (cadera) a ratones Swiss-Webster de 6-8 semanas de edad en la semana 0 y 4. Se recolectaron muestras de sangre en la semana 0 y 4, y un sangrado se ejecutó en la semana 6.

Ensayo bactericida:

Ensayos bactericidas se desarrollaron esencialmente como se describe (ver Mountzouros y Howell, 2000, *J. Cliln. MIcrobiol.* 38(8): 2878-2884). Títulos bactericidas dependientes de anticuerpo mediado por complemento para el SBA se expresaron como el recíproco de la dilución mayor del suero de ensayo que mató ≥50% de las células objetivo introducidas en los ensayos (título BC_{50}).

Métodos utilizados para identificar la proteína 2086:

Clivaje de Bromuro de Cianógeno y secuenciación directa de fragmentos:

Clivaje de Bromuro de Cianógeno de Fracción No Adsorbida de Intercambio de Anión (AEUF). Se precipitó AEUF con 90% de etanol frío y se solubilizó con 100 mg/ml de bromuro de

cianógeno en 70% de ácido fórmico para una concentración de proteína de 1 mg/mL. La reacción se desarrolló durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. Los productos clivados fueron secados mediante vacío rápido, y la pastilla se solubilizó con TX-100 reducido con HE/0,1%. SDS-PAGE seguido por secuenciación de aminoácido N-terminal se utilizó para identificar los componentes de esta fracción.

Secuenciación de digestión de proteasa/fase inversa/N-terminal para identificar componentes:

Se digirió AEUF con GluC (V8), LysC o ArgC. La proporción de proteína a enzima fue de 30 µg de proteína a 1 µg de enzima. La digestión se llevó a cabo a 37° C durante la noche. La mezcla de proteína digerida (30 µg) se pasó sobre una columna de 7 micrones de Aquapore RF-300 y se eluyó con un gradiente de 10-95% de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético, y los picos se recolectaron manualmente. También se ejecutó un ensayo en blanco sin proteína, y los picos de este se sustrajeron del cromatograma de la muestra. Los picos que solo ocurren en la ejecución de las muestras fueron analizados mediante espectrómetro de masa, y aquellas muestras que dieron una masa clara fueron analizadas para secuenciación de aminoácido N-terminal.

310

Secuenciación de aminoácido N-terminal:

Para bandas escindidas de una mancha, la muestra de proteína se transfirió desde un gel SDS a una membrana PVDF, teñida con Negro Amido (10% de ácido acético, 0,1% de Negro Amido en agua desionizada) y desteñido en 10% de ácido acético. La banda de proteína deseada es luego escindida de todas las diez líneas utilizando un escalpelo limpiado con metanol o cuchillo mini-Exacto y colocado en la región de cartucho del Secuenciador de Proteína 477A de Applied Biosystems. Para secuenciamiento directo de las muestras en solución, el cartucho Prosorb se ensambla y luego el PVDF se humedece con 60 µL de metanol. El PVDF se enjuaga con 50 µL de agua desionizada y la muestra (50 µL) se carga al PVDF. Después se utiliza 50 µL de agua desionizada para enjuagar la mezcla, el PVDF Prosorb es sacado, y colocado en el cartucho de reacción del Secuenciador de Proteína 447A de Applied Biosystems. Para ambos métodos, el Secuenciador N-Terminal de Applied Biosystems se ejecuta luego bajo condiciones de mancha óptimas para 12 o más ciclos (1 Blanco de ciclo, 1 ciclo Estándar, y 10 o más ciclos para identificación de residuos deseados) y la detección de aminoácido PTH se hace en el Analizador PTH 120A de Applied Biosystems. Los ciclos se recolectan en una grabadora de diagramas análogos y digitalmente por vía de software de instrumentos. La

asignación de aminoácidos se hace utilizando los datos análogos y digitales mediante comparación con un conjunto estándar de aminoácidos PHT y sus respectivos tiempos de retención en el analizador (los residuos de cisteína se destruyen durante la conversión y no se detectan). La información de secuencia múltiple se puede obtener desde un residuo simple y primario versus asignaciones secundarias que se hacen basados en la intensidad de señal.

LC-MS/MS

Las muestras de proteína purificadas por IEF fueron adicionalmente analizadas mediante electroforesis de gel de poliacrilamida SDS. Las proteínas se visualizaron mediante teñido azul Coomaasie, y bandas de interés fueron escindidas manualmente, luego reducidas, alquilatadas y digeridas con tripsina (Promega, Madison, WI) *in situ* utilizando un robot de digestión tríptico en gel automatizado (1). Después de digestión, los extractos de péptido se concentraron hasta un volumen final de 10-20 µL utilizando un Savant Speed Vac Concentrador (ThermoQuest, Holdbrook, NY).

Se analizaron los extractos de péptidos en HPLC de fase inversa de microelectrorociado automatizado. En resumen, la interfaz de microelectrorociado consistió de una aguja de

rociado de sílice fusionada con Picofrit, 50 cm de longitud por 75 um ID, 8 um de diámetro de orificio (New Objective, Cambridge, MA) empacado con gotas de fase inversa C18 de 10 um (YMC, Wilmington, NC) a una longitud de 10 cm. La aguja Picofrit se montó en un soporte óptico de fibra (Melles Griot, Irving, CA) mantenido en su posición base en el frente del detector de espectrómetro de masa. La parte trasera de la columna fue sondeada a través de una unión de titanio para suministrar una conexión eléctrica para la interfaz de electrorociado. La unión se conectó con una longitud de tubería (FSC) de capilaridad de silica fusionada a un automuestreador FAMOS (LC_Packings, San Francisco, CA) que se conectó a una bomba de solvente de HPLC (ABI 140C, Perkin-Elmer, Norwalk, CT). La bomba de solvente HPLC suministra un flujo de 50 µL/min que se reduce a 250 nL/min utilizando una tubería de división en T de microajuste PEEK (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA), y luego administrado a un automuestreador que utiliza una línea de transferencia FSC. La bomba LC y el automuestreador fueron cada uno controlados utilizando sus programas de usuario internos. Las muestras se insertaron en frascos del utomuestreador plástico, sellados, e inyectados utilizando una argolla de muestra de 5 µL.

Espectrometría de masa-HPLC de microcapilaridad

Péptidos extraídos de digestiones en gel se separaron mediante el sistema HPLC de microelectrorociado que utiliza un gradiente de 50 minutos de 0-50% de solvente B (A:0,1M HoAc, B:90% MeCN/0,1M HoAc). Los análisis de péptido fueron hechos sobre un espectrómetro de masa de trampa de ión Finnigan LCQ (ThermoQuest, San Jose, CA) que opera en un voltaje de rociado de 1,5 kV, y utiliza una temperatura de capilar calentado de 150° C. Los datos se adquirieron en el modo MS/MS automatizado que utiliza el software de adquisición de datos suministrado con el instrumento. El método de adquisición incluye 1 MS de exploración (375-1200 m/z) seguido por exploraciones MS/MS de los 3 más altos iones abundantes en la exploración MS. Las funciones de exclusión de isótopo y exclusión dinámica se emplearon para incrementar el número de iones de péptido que se analizaron (ajustes: 3 amu=ancho de exclusión, 3 min=duración de exclusión, 30 segs=duración de pre-exclusión, 3 amu=amplitud de exclusión del isótopo). El análisis automatizado de los datos MS/MS se desarrolló utilizando el algoritmo de computador SEQUEST incorporado dentro del paquete de análisis de datos Finnigan Bioworks (ThermoQuest, San Jose, CA) que utiliza la base de datos de proteínas derivadas del genoma completo de *N.*

meningitidis (de Sanger). Los resultados del estudio se ilustran en la FIG. 3.

Ejemplo 2

Clonación de P2086 Lipidado Recombinante (rLP2086)

A.) Secuencia Líder Nativa:

Materiales de Fuente:

El gen ORF 2086 se amplificó mediante PCR a partir de un aislado de una cepa de serogrupo B *Neisseria meningitidis* designada 8529. El serogrupo, el serotipo y el serosubtipo de esta cepa se muestran en paréntesis; 8529 (B:15, P1:7b,3). Esta cepa meningococal se recibió del RIVM, Bilthoven, Holanda. La secuencia de gen de proteína 2086 madura de la cepa meningococal 8529 se suministra aquí como la ID DE SEC NO: 212.

Estrategia de Clonación y Amplificación PCR:

Una inspección visual del ORF 2086 indica que este gen tiene una secuencia de señal de lipoproteína potencial. Análisis adicional que utiliza un algoritmo de Lipoproteína. Modelo Hidden Harkov propietario confirma que el ORF2086 contiene una secuencia de señal de lipoproteína. Con el fin de expresar recombinantemente el P2086 en una conformación

similar a la nativa, los cebadores de oligonucleótido se diseñaron para amplificar la longitud completa del gen con la secuencia de señal de lipoproteína intacta y se basó en un análisis de la secuencia Sanger para *N. meningitidis* A ORF2086, _(cebador 5' - CT ATT CTG CAT ATG ACT AGG AGC y cebador 3' - GCGC GGATCC TTA CTG CTT GGC GGC AAG ACC), que son la ID DE SEC NO: 304 (compuesto No. 4624) e ID DE SEC NO: 303 (compuesto No. 4623), respectivamente (ver también Tabla IV aquí). El gen 2086 se amplificó mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR)[ciclizador térmico ABI 2400, Applied Biosystems, Foster City, CA] de la cepa 8529 *N. meningitidis*. El producto amplificado de tamaño correcto se ligó y clonó en PCR 2.1-TOPO (Invitrogen). El ADN de plásmido se digirió con restricción con NdeI y BamHI, purificado con gel y ligado en el vector pET-27b(+) (Novagen).

Los cebadores de oligonucleótido descritos aquí, se sintetizaron en un sintetizador de oligionucleótido PerSeptive Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, que utiliza química β-Cianoetilfosforamidita, Applied Biosystems, Foster City CA. Los cebadores utilizados para amplificación PCR de las familias de gen ORF2086 se listan en la Tabla IV, que muestra ejemplos no limitantes de cebadores de la presente invención.

TABLA IV: CEBADORES

ID DE SEC NO. (Compuesto No)	Cebador	Secuencia	Sitios de restricción
303 (4623)	Inverso	GCGCGGATCCTTACTGCTTGGCGGCAAGACC	BamHI
304 (4624)	Delantero	CTATTCTGCATATGACTAGGAGC	NdeI
305 (4625)	Delantero	AGCAGCGGAGGCGGCGGTGTC	
306 (5005)	Delantero	TGCCGATGCACTAACCGCACC	
307 (5007)	Inverso	CGTTTCGCAACCATCTTCCCG	
308 (5135)	Inverso	GAGATCTCACTCACTCATTACTGCTTGGCGGCAAGACCGATATG	BglII
309 (5658)	Delantero	GCGGATCCAGCGGAGGGGGTGGTGTCGCC	BamHI
310 (5660)	Inverso	GCGCATGCTTACTGCTTGGCGGCAAGACCGATATG	SphI
311 (6385)	Delantero	GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGAAGC	BamHI
312 (6406)	Delantero	GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGGGGTGGTGTCGCCGCCGAYATWGGTGCGGGGCTTGCCG	BglII y NdeI
313 (6470)	Delantero	CTATTCTGCGTATGACTAG	
314 (6472)	Inverso	GTCCGAACGGTAAATTATCGTG	
315 (6473)	Delantero	GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCC	BamHI
316 (6474)	Delantero	GAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCGGCGGAAGC	BglII y NdeI
317 (6495)	Delantero	GACAGCCTGATAAACC	

318 .(6496)	Inverso	GATGCCGATTTCGTGAACC	
319 (6543)	Inverso	GCGCATGCCTACTGTTTGCCGGCGATG	SphI
320 (6605)	Inverso	GAGATCTCACTCACTCACTACTGTTTGCC GGCGATGCCGATTTC	Bg1II
321 (6721)	Delantero	GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCG GCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCACCGCC GACATAGGCACG	Bg1II y NdeI

Expresión de lipoproteína rLP2086 que utiliza secuencia líder nativa:

Con referncia a la FIG. 5, el plásmido pPX7340 se transformó/transfectó o infecto dentro células huésped BLR(DE3) pLysS (Life Sciences). Se seleccionó un transformante e inoculó en 50 mL de Terrific Broth que contiene 2% de glucosa, canamicina (30 µg/mL), cloramfenicol (30 µg/mL), y tetraciclina (12 µg/mL). El OD600 para el cultivo durante la noche fue de 6,0. El cultivo se diluyó durante la noche en 1 litro de Terrific Broth con 1% de glicerol y los mismos antibióticos. El OD600 de partida fue 0,4. Después de 2 horas el OD600 fue de 1,6 y la muestra pre-inducida se tomó. Las células equivalentes a un OD600=1 se centrifugaron y el supernadante se removió. La pastilla de célula completa fue resuspendida en 150 µL de amortiguador

Tris-EDTA y 150 µL de amortiguador de muestra 2x SDS-PAGE. Se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de 3,5 horas una muestra post-inducida se tomó como se describe y analiza en SDS-PAGE (ver FIG. 4).

Purificación de rLP2086:

Se solubilizó rLP2086 de *E. coli* siguiendo la extracción de detergente diferencial. A diferencia del P2086 en su ambiente nativo, el rLP2086 no fue solubilizado significativamente mediante el Triton X-100 o el Zwittergente 3-12. La masa del rLP2086 se solubilizó con sarcosil, que indica que este interactúa con componentes de membrana exterior de *E. coli* en forma diferente en que esta lo hace en *N. meningitidis*. Una vez solubilizado el rLP2086 se purificó de forma similar a la proteína nativa en que muchas de las proteínas *E. coli* contaminantes puedan ser removidas mediante adsorción a una resina de intercambio de anión en pH 8. A pesar de ser mayor que una mitad de una unidad de pH sobre su pI teórico, el rLP2086 se mantuvo no adsorbido a pH 8. Además se alcanzó la purificación mediante la adsorción del rLP2086 a una resina de intercambio de catión en pH 4,5.

La homogeneidad del rLP2086 se muestra en la FIG. 2 luego de SDS-PAGE. La masa del rLP2086 se determinó mediante análisis

de espectro de masa de MALDI-TOF para ser 27,836. Esta masa difiere de la masa teórica de 27,100 por 736, que aproxima la masa de la modificación del lípido N-terminal común a las lipoproteínas bacteriales. Ambos los nativos y el rLP2086 parecen ser lipoproteínas de membrana exterior. Intentos con secuenciación N-terminal se bloquearon y esto es consistente con la modificación terminal.

Métodos de Purificación:

Pastillas congeladas de células BLR DE3 pLysS que expresan P2086 se reesuspendieron en 10 mM de inhibidor de proteasa Peflaboc SC HEPES-NaOH/1 mM EDTA/1 µg/mL (Roche) pH 7,4 (HEP) en 20 mL/g de peso celular húmedo y lisado medianto mediante microfluidizador (Microfluidics Corporation Model 110Y). El lisato celular se centrifugó a 150000 x g durante una hora. La pastilla se lavó dos veces con HEP y se centrifugó dos veces, y la pastilla de membrana resultante se congeló durante la noche. La pastilla se solubilizó con 10 mM HEPES-NaOH/1 mM MgCl2/1%TX-100 pH 7,4 durante 30 minutos, seguido por centrifugación a 150000 x g durante 30 minutos. Esto se repitió tres veces. La pastilla de membrana se lavó como se mencionó anteriormente dos veces con 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Zwittergente 3-12 pH 8, seguido por dos lavadas cada una de 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Zwittergente 3-14 pH 8 y

320

50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Zwittergente 3-14/0,5 M de NaCl pH 8.

El rLP2086 luego se solubilizó con 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/1% sarcosil pH 8. Este extracto de sarcosil se ajustó a 1% de Zwittergente 3-14 (Z3-14) y se dializó contra un exceso de 30 veces de 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Z3-14. El extracto rLP2086 dializado se precipitó con 90% de etanol para remover el sarcosil restante, y se solubilizó con 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Z3-14 pH 8 (TEZ). El material insoluble se removió mediante centrifugación, el supernadante se pasó sobre una columna de cromatografía de intercambio de anión, y el rLP2086 se recolectó en la fracción no unida. El material no unido fue luego dializado dos veces contra un exceso de 30 veces de 25 mM de NaAc/1% Z3-14 pH 4,5, y pasado sobre una columna de cromatografía de intercambio de catión. El rLP2086 se eluyó con un gradiente de 0-0,3M de NaCl y se analilzó por SDS-PAGE (teñido Coomassie). La fuente rLP2086 se determinó para ser 84% puro mediante densitometría láser.

Actividad Bactericida y Reactividad de Superficie de Antisuero para la Subfamilia B de rLP2086

Con referencia a la Tabla VII, el antisuero para rLP2086 purificado de la cepa 8529 de Subfamilia B. demoostró la

reactividad de la superficie a todas las diez cepas de Subfamilia B 2086 ensayadas para el ELISA de célula completo. La actividad bactericida se detectó contra nueve de las diez cepas de Subfamilia B 2086 que expresan antígenos de serosubtipo heterólogo, PorAs. Estas cepas son representativas de las cepas que originan la enfermedad meningococal de serogrupo B a través del oeste de Europa, las Américas, Australia, y Nueva Zelanda. La cepa sola que no fue muerta por el ensayo bactericida, 870227, reaccionó fuertemente con el suero anti-rLP2086 (Subfamilis B) mediante el ELISA de célula completo, lo que indica que esta cepa expresa una proteína con epitopes en común para P2086.

Las cepas de Subfamilia A 2086 en la Tabla VII, también fueron ensayadas para reactividad de superficie mediante el ELISA de célula completo. Dos de las tres de estas cepas parecieron tener un muy bajo nivel de reactividad, lo que indica que algunas de las cepas de Subfamilia A 2086 pueden no ser reactivas cruzadas con anticuerpos elevados a la Subfamilia B rLP2086. El procedimiento de amplificación del PCR utilizado para identificar el gen de la Subfamilia B 2086 de la cepa 8529 también se desarrolló en las cepas 870446, NMB y 6557. No se detectó producto amplificado PCR de Subfamilia B 2086.

Métodos de Inmunogenicidad:

Preparación de antisuero:

Se formularon vacunas como se describió previamente en el Ejemplo 1. Sin embargo se utilizó una dosis de 10 µg.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima celular completa (ELISA):

Las suspensiones celulares completas de *N. meningitidis* se diluyeron a una densidad óptica de 0,1 a 620 nm en 0,01M de Fosfato estéril, 0,137M de NaCl, 0,002M de KCl (PBS). De esta suspensión, se agregaron 0,1 mL a cada pozo de placas de 96 pozos Nunc Bac T (Cat#2-69620). Las células se secaron sobre placas a temperatura ambiente durante tres días, luego se taparon, se invirtieron y almacenaron a 4° C. Las placas fueron lavadas tres veces con amortiguador (0,01M Tris-HCl, 0,139M NaCl/KCl, 0,1% dodecilpoli(oxietilerenoglicoleter)$_n$ n=23 (Brij-35®, disponible de ICI Americas, Inc., wilmington, Delaware), pH 7,0-7,4). Las diluciones de antisuero se prepararon en PBS, 0,05% de Tween-20/Azida y 0,1 mL se transfirieron a las placas cubiertas. Las placas se incubaron durante dos horas a 37° C. Las placas fueron lavadas tres veces en amortiguador de lavado. Se diluyó IgG AP cabra-anti-ratón (Southern Biotech) a 1:1500 en PBS/0,05% Tween-20, 0,1

mL se agregó a cada pozo, y las placas se incubaron a 37° C durante dos horas. Las placas se lavaron (como se mencionó anteriormente). La solución de sustrato se preparó al diluir fosfato p-nitrofenilo (Sigma) en 1M de dietanolamina/0,5 mM de $MgCl_2$ a 1 mg/mL. Se agregó sustrato a la placa a 0,1 mL por pozo y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La reacción se detuvo con 50 µL/pozo de 3N de NaOH y las placas se leyeron a 405 nm con 690 nm de referencia.

B.) Secuencia Líder P4:

Estrategia de Clonación y Amplificación PCR:

Con el fin de optimizar la expresión rLP2086, el gen 2086 se clonó detrás de la secuencia de señal P4 del no tipificable *Haemophilus influenzae* (Green et al., 1991). Los cebadores utilizados para clonación de lipoproteína se listan en la Tabla IV y se identifican mediante los números de compuestos: 5658, 5660, 6473, 6543 y 6385. El ORF 2086 se amplificó de la cepa B 8529 de *N. meningitidis* utilizando cebadores con los siguientes números de compuesto 5658 y 5660. El ORF 2086 se amplificó de la cepa CDC1573 del serogrupo B de *N. meningitidis* utilizando cebadores con los siguientes números de compuesto 6385 y 5660. El ORF 2086 se amplificó de la cepa 2996 del serogrupo B de *N. Meningitidis* utilizando cebadores con los siguientes números de compuesto 6473 y 6543. Los

cebadores N-terminal (5') se diseñaron para ser homólogos a la región madura del gen 2086 (iniciando en el residuo de serina en la posición de aminoácido 3 solo corriente debajo de la cisteína). El sitio de restricción BamHI (GGATTC) se incorporó dentro del extremo 5' de cada cebador N-terminal y resultó en la inserción de un residuo glicina en la proteína madura en la posición de aminoácido 2. Los cebadores C-terminal (3') se diseñaron para ser homólogos al extremo C-terminal del gen 2086 y se incluyó el codón de Parada así como también un sitio SphI para propósitos de clonación. El fragmento amplificado de cada cepa B de *N. meningitidis* se clonó en un vector intermedio y se seleccionó mediante análisis de secuencia.

El plásmido de ADN de los clones correctos fue digerido con enzimas de restricción BamHI y SphI (New England Biolabs, (NEB)). Se escogió un vector diseñado pLP339 (suministrado por el cesionario del solicitante) como el vector de expresión. Este vector utiliza la estructura pBAD18-Cm (Beckwith *et al.*, 1995) y contiene la secuencia de señal de lipoproteína y el gen P4 del *Haemophilus influenzae* no tipificable (Green et al., 1991). Se digirió parcialmente el vector pLP339 con la enzima de restricción BamHI y luego se sometió a digestió SphI. Los fragmentos amplificados 2086 (BamHi/SphI) fueron cada uno ligados por separado en el

vector pLP339 (BamHI/SphI parcial). Esta estrategia de clonación coloca el gen 2086 maduro detrás de la secuencia de señal de lipoproteína P4. El sitio BamHI restante en la unión de clonación entre la secuencia de señal P4 y el gen 2086 (ver la construcción de plásmidos mostrada en la FIG. 7). El siguiente es un ejemplo de la secuencia en la unión de clonación BamHI:

[secuencia de señal P4]- TGT GGA TCC -[secuencia de ácido nucleico maduro 2086 restante]
[secuencia de señal P4]- Cys Gly Ser -[secuencia de ácido nucleico maduro 2086 restante]

Con referencia a la FIG. 7, cada fragmento amplificado fue clonado en un vector pBAD18-Cm modificado que contiene la secuencia líder P4. La fermentación fue desarrollada en BLR pPX7343 de *E. coli* recombinante que expresa rP4LP2086 (2086 lipidado de P4 recombinante) para tratar de incrementar la densidad celular al agregar glucosa adicional. El fermentador se llenó con 10 L de medio Mínimo M9 completo, de acuerdo con Sambrook, complementado con 1% de glucosa.

La concentración inicial de la glucosa en el fermentador fue de 45 g/L. El fermentador se inoculó para un OD inicial de ~0,25. En ~OD 25, se agregó 20g/L de glucosa adicional. El

cultivo fue inducido con 1% de arabinosa en agotamiento de glucosa en OD 63,4. La fermentación continuó hasta 3 horas después de inducción. Las muestras se guardaron a t=0, 1, 2, 3 post inducción y la proteína cuantificada utilizando BSA. En t=3, el rendimiento de la proteína es ~0,35 g/L, y 7% de proteína celular total. Un total de 895 gramos de pasta celular húmeda fue cultivado de ~10 L de cultivo.

La purificación del rP4LP2086 se desarrolló al utilizar los mismos métodos como se describieron anteriormente en el Ejemplo 2, sección A.

Ejemplo 3

Desarrollo Genético Para la Proteína 2086 Madura No-lipidada:

Para evaluación adicional de la inmunogenicidad de la proteína 2086, se desarrolló la expresión y clonación de la forma no lipidada del P2086.

Amplificación de gen PCR del ORF 2086:

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación PCR del gen 2086 no lipidado se listan en la tabla de cebadores, Tabla IV. El gen 2086 de la cepa 8529 se puede amplificar con los cebadores identificados por los números de compuestos

5135 y 6406 (ID DE SEC NO: 308 y 312, respectivamente), como se indica en la tabla. El gen 2086 de la cepa CDC1573 puede ser amplificado con los cebadores identificados por los números de compuestos 5135 y 6474 (ID DE SEC NO: 308 y 316, respectivamente). El gen 2086 de la cepa 2996 puede ser amplificado con los cebadores identificados por los números de compuestos 6406 y 6605 (ID DE SEC NO: 312 y 320, respectivamente).

Las características de estos cebadores incluyen, un sitio de restricción Bg1II sintético en cada cebador, un sitio de restricción NdeI sintético en números de compuestos 6406 y 6474 y codones de terminación en todos los tres marcos de lectura que están presentes en los números de compuestos 5135 y 6605. Los números de cebadores 6406 y 6474 amplifican el gen 2086 con un ATG(Met) fusionado al segundo codón terminal amino (ACG) que representa una sustitucióin de aminoácido sencilla (reemplaza TGC Cys) del polipéptido 2086 maduro.

El vector de clonación PCR era TOPO-PCR2.1, Invitrogen, Valencia, CA.

El vector utilizado para expresar la proteína 2086 no lipidada era pET9a de Novagen, Madison, WI.

La cepa de clonación *E. coli* era Top10, Invitrogen, Carlsbad, CA.

La cepa de expresión *E. Coli* era BLR(DE3)pLysS, Novagen, Madison, WI.

El medio de cutivo para propósitos de clonación era Terrific Broth líquido o agar, de acuerdo con Sambrook *et al.*, con 1% de glucosa estéril sustituida para glicerol, y el antibiótico apropiado (ampicilina o canamicina).

La purificación del plásmido fue con el Kit Qiagen Spin Miniprep (Valencia, CA).

Preparación de la cepa de producción o línea celular para la expresión 2086 No-lipidada:

El gen 2086 se amplificó mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) [ciclizador térmico AmpliTaq y ABI 2400, Appliled Biosystems, Foster City, CA] a partir de ADN cromosomal derivado de la cepa meningococal 8529. La amplificación PCR del gen 2086 utilizó dos cebadores de oligonucleótido en cada reacción identificada por los números de compuestos 6474 y 5135 (ID DE SEC NO: 316 y 308, respectivamente). El producto PCR 2086 amplificado fue

clonado directamente en un vector de clonación TOPO-PCR2.1 y seleccinado en agar Terrific Broth complementado con 100 µg/mL de ampicilina y 20 µg/mL X-Gal. Colonias blancas se seleccionaron y crecieron. El ADN de plásmido se prepara al utilizar un Kit Qiagen Miniprep y los plásmidos fueron seleccionados para la inserción del fragmento PCR. Los plásmidos de inserto PCR se sometieron a secuenciación de ADN (química Big Dye en un secuenciador ABI377, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los plásmidos que exhiben la secuencia de ADN correcta se digerieron con la enzima de restricción Bg1II y el fragmento Bg1II fue gel purificado utilizando un kit de purificación GeneClean II (Bio101, Carlsbad, CA). El fragmento Bg1II purificado se clonó en el sitio BamHI del vector de expresión pET9a. Los clones pET9a/2086 se seleccionaron en placas Terrific Broth complementadas con 30 µg/mL de canamicina. Los clones resistentes a la canamicina crecieron y se preparó ADN de plásmido miniprep. Los plásmidos fueron seleccionados para la orientación apropiada del gen 2086 en el sitio BamHI. Los plásmidos orientados correctamente representan una fusión del antígeno T7 para el terminal amino del gen 2086 (rP2086T7). Estas fusiones de gen rP2086T7 se transformaron en BLR(DE3)pLysS, seleccionado en placas Terrific Broth/Kan, crecieron en Terrific Broth e inducidas para expresar la

proteína de fusión rP2086T7 con 1 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosida). La proteína de fusión rP2086T7 se expresó en altos niveles.

Estos plásmidos de fusión se sometieron luego a digestión de restricción NdeI, que elimina el antígeno T7 y liga el gen 2086 maduro directamente al ATG de partida suministrado por el vector. Estos plásmidos eliminados NdeI se transformaron en las células Top10 y se seleccionan en placas Terrific Broth/Kan. Los clones candidatos se cultivaron y se preparó ADN de plásmido miniprep. El plásmido de ADN se sometió a secuenciación de ADN para confirmar la eliminación y la integridad de la secuencia del gen 2086. Estos plásmidos se representan por el mapa de plásmido diseñado pPX7328 (FIG. 6). Los plásmidos que representan la secuencia de ADN correcta se transformaron en BLR(DE3)pLysS, seleccionados en placas Terrific Broth/Kan, se cultivaron en Terrific Broth y se indujo para expresar la proteína 2086 con IPTG. El vector pET9a falló para expresar la proteína 2086 madura, en la cepa BLR(DE3)pLysS, cuando se removió el T7-Tag.

Producción de la proteína 2086 No-lipidada:

Los plásmidos de ADN purificado se utilizaron para transformar la expresión de la cepa BLR(DE3)pLysS. Las

331

células de BLR(DE3)pLysS que llevan los plásmidos son resistentes a la canamicina y se pueden inducir para expresar altos niveles de proteína PorA mediante la adición de 1 mM de IPTG. La proteína de fusión rP2086T7 se puede expresar como cuerpos de inclusión insolubles en la BLR(ED3)pLysS de línea celular *E. coli* en ~40% de proteína total. Esta proteína de fusión purificada se utilizó para inmunizar ratones y los niveles significativos generados de anticuerpos bactericidas contra una cepa meningococal heteróloga. (Ver Tabla V)

Mutagénesis de gen No-lipidado 2086:

La mutagénesis del cebador PCR se desarrolló en el extremo 5' del gen 2086. Los estudios de expresión están debajo de la forma para determinar si el T7-Tag puede ser removido mientras exhibe los altos niveles de expresión del rP2086T7 maduro.

Purificación de rP2086T7 No-lipidado:

Céllulas BLR(DE3)pLysS de *E. coli* que expresan rP2086T7 no-lipidado fueron lisadas mediante microfluidizador en 10 mM de Hepes-NaOH/5 mM EDTA/1 mM Pefabloc SC pH 7,4. El lisato de las células fue luego centrifugado a 18000xg durante 30 minutos. La pastilla de cuerpo de inclusión fue lavada tres

veces con 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/1% TritonX-100 pH 8 seguido por centrifugación cada vez a 240000xg durante 30 minutos. La pastilla de cuerpo de inclusión fue luego lavada dos veces con 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Zwittergente 3-14 pH 8 seguido por centrifugación cada vez a 24000xg durante 15 min. La pastilla de cuerpo de inclusión fue luego solubilizada con 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/4M de Urea pH 8 durante dos horas seguido de centrifugación para remover el material insoluble. El supernadante (rP2086T7 solubilizado) fue dividido en cuatro muestras iguales. Una muestra se ajustó a 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2M Urea pH 8 (sin detergente), se ajustó una a 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2M Urea/1% Triton X-100 pH 8 (TX-100) hidrogenado, una se ajustó a 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2M Urea/1% Zwittergente 3-12 pH 8 (Z3-12), y una se ajustó a 50 mM de Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2M Urea/1% Zwittergente 3-14 pH 8 (Z3-14) utilizando soluciones de depósito. Para remover la úrea, se dializaron muestras para complejación contra el amortiguador respectivo que no contiene úrea. Las muestras fueron luego dializadas para terminar contra el respectivo amortiguador que no contiene úrea y 60 mM de NaCl para reducir la concentración de NaCl. El material insoluble se removió mediante centrifugación a 2000xg por 15 minutos, y el supernadante resultante (rP2086T7 redoblado) utilizado para experimentos adicionales. La

homogeneidad del rP2086T7 se encontró que es 91-95% como se determinó al utilizar el SDS-PAGE teñido Coomassie y densitometría láser.

Procedimiento de Inmunogenicidad - Como se describió en el Ejemplo 2

Esta proteína de fusión purificada fue utilizada para inmunizar ratones y niveles importantes generados de anticuerpos bactericidas contra una cepa meningococal heteróloga. (Ver Tabla V adelante):

TABLA V:Títulos bactericidas de anticuerpos de ratón elevados a rP2086T7

SUERO DE RATÓN	DESCRIPCIÓN	CEPA/H44/76 HETERÓLOGA
AF780 semana 6	R2086T7, 10 ug	3200
Semana 0 fuente	Suero pre-inmune	10
AE203 semana 6	rLP2086, 10 ug (control positivo)*	6400

(*suero de control positivo generado mediante inmunización de ratón con rLP2086)

Ejemplo 4

Desarrollo de Clones Quiméricos de ORF 2086

La región N-terminal del gen 2086 de la cepa CDC-1573 contiene un segmento repetido no presente en el gen 2086 de las cepas 8529 y 2996 (ver FIG. 8). Parece que este segmento repetido es responsable por los niveles incrementados de la expresión de proteína recombinante 2086 de los dos sistemas de expresión basados en *E. coli* (pET y pBAD). El nivel de expresión de proteína recombinante del gen 2086 CDC-1573 fue significativamente mejor en los sistemas de expresión pET y pBAD según se comparó con los niveles de expresión recombinantes del gen 2086 con las cepas 8529 y 2996 que utilizan los mismos sistemas. La región N-terminal de gen 2086 de todas las tres cepas es relativamente homólogo, excepto para su segmento repetido. Por lo tanto, es razonable asumir que al fusionar el CDC-1573 N-terminal a los genes 2086 de las cepas 8529 y 2996, que los niveles de proteína recombinante 2086 expresados de estos genes se incrementará cuando se utilizan los sistemas pET y pBAD.

Métodos y Materiales:

El ADN cromosomal de las cepas 8529 y 2996 se purificó y utilizó como una plantilla para la amplificación PCR del gen quimérico 2086. Los cebadores PCR con los números de compuesto 6721 y 5135 (ID DE SEC NO: 321 y 308, respectivamente) se utilizaron para amplificar el gen

quimérico 2086 de la cepa 8529 y los cebadores PCR con los números de compuesto 6721 y 6605 (ID DE SEC NO: 321 y 320, respectivamente) se utilizaron para amplificar el gen quimérico 2086 de la cepa 2996. Los productos PCR se clonaron directamente en el vector PCR2.1 TOPO de Invitrogen y luego seleccionados mediante análisis de secuencia de ADN para identificar un gen quimérico 2086 intacto. Ese gen fue luego clivado del vector PCR2.1 con BG1II y el fragmento Bg1II se insertó dentro del sitio BamHI del plásmido pET9a. Los insertos de plásmido fueron seleccionados para la orientación apropiada y luego sometidos a una digestión NdeI. Los fragmentos NdeI lineales fueron autoligados para alcanzar la eliminación de un fragmento NdeI pequeño que contiene la secuencia T7-Tag contribuida por el vector pET9a. Esta eliminación liga directamente el promotor T7 al extremo 5' del gen quimérico 2086. El plásmido eliminado NdeI se transformó en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* y las colonias resistentes a la canamicina se seleccionaron para expresión de proteína 2086 quimérica con inducción IPTG.

Estudios iniciales indican que el gen 2086 quimérico de la cepa 2996 expresa cerca de dos veces por mucho la proteína recombinante según se comparó con el gen 2996/2086 nativo cuando se expresa en el sistema pET9a. El sistema pBAD no se ha ensayado aún.

Aunque solo un experimento se ha desarrollado, los datos indican que existe una utilidad mejorada del gen 2086 quimérico. La generación de fusiones CDC-1573 N-terminal a los genes 2086 de las cepas 8529 y 2996 suministra expresión de proteína 2086 recombinante mejorada.

EJEMPLO 5

Selección PCR 2086 de cepas *N. meningitidis*:

Con el fin de determinar la conservación del gen 2086 entre los aislados clínicos, la amplificación PCR se desarrolló en 88 cepas de *N. meningitidis*.

La identificación PCR inicial del ORF 2086 utilizó cebadores listados en la Tabla IV (ver Ejemplo 2 anterior) identificado por los números de compuesto: 4623, 4624 y 4625 (ID DE SEC NO: 303, 304 y 305, respectivamente). Estos cebadores fueron diseñados basados en la secuencia de serogrupo A de *N. meningitidis* de Sanger. Para facilitar la selección de un gran número de cepas, cebadores internos se diseñaron para el gen 2086. Un total de 88 cepas de *N. meningitidis* fueron seleccionadas mediante PCR con los cebadores 2086 internos nuevamente diseñados identificados mediante los números de compuesto 5005 y 5007 (ID DE SEC NO: 306 y 307). Con estos

cebadores los solicitantes fueron capaces de identificar el gen 2086 de 63 de las 88 cepas de *N. meningitidis* (~70%) (ver Tabla VI-A).

Las regiones circundantes expandidas al gen 2086 en la secuencia de serogrupo A de *N. meningitidis* de Sanger y la secuencia de serogrupo B de *N. meningitidis* de TIGR se examinaron y alinearon. Los cebadores fueron diseñados para corresponder a regiones corriente arriba y corriente abajo del gen 2086. El propósito era utilizar estos cebadores para amplificar más de la longitud total de los genes 2086 de una variedad de cepas de *N. meningitidis* para comparación de secuencia. La amplificación PCR de una cepa (6557), que utiliza números de Compuesto 6470 y 6472 (ID DE SEC NO: 313 y 314, respectivamente), resulta en una baja producción de producto. La cepa 6557 de producto amplificado fue clonada y el ADN de plásmido fue presentado para análisis de secuencia. Los resultados indican un tipo nuevo de gen 2086 con mayor secuencia de variabilidad de lo que se ha visto previamente. El gen 2086 de la cepa 6557 fue ~75% idéntico al nivel de aminoácido a otras cepas secuenciadas. En forma interesante, la cepa 6557 fue una del 30% de cepas que han sido previamente ensayadas negativas por el PCR 2086 de selección descrito anteriormente.

Los cebadores internos específicos a las regiones variables C-terminal dentro de la cepa 6557 se diseñaron. Estos cebadores se utlizaron para seleccionar el gen 2086 más variable en el ~30% de las cepas que han sido previamente ensayadas negativas por la selección PCR 2086. Todas la cepas *N. meningitidis* disponibles (n=88) fueron seleccionadas mediante PCR con estos cebadores 2086 internos nuevamente identificados (identificados mediante los números de compuesto 6495 y 6496; ID DE SEC NO: 159 y 160, respectivamente). Solo el ~30% de cepas de *N. meningitidis* que han sido previamente ensayadas negativas por PCR para 2086 fueron PCR positivas en esta selección. El conjunto de genes amplificados de las cepas negativas PCR previas (~30%) pueden representar un nuevo tipo de gen 2086 o una segunda familia de genes 2086 y aquí se desiga una Subfamilia A 2086. El conjunto de genes 2086 amplificado del ~70% de las cepas con cebadores derivados de 8529 son designados aquí Subfamilia B.

La Subfamilia A de genes 2086 se ejemplifica mediante las ID DE SEC NOS: 1-173 numeradas impares sin limitación. La Subfamilia B de genes 2086 se ejemplifica, sin limitación, mediante las ID DE SEC NOS: 175-251 numeradas impares.

Las cepas de *N. meningitidis* que se utilizan para estudios de amplificación PCR fueron seleccionadas de las siguientes tablas, Tabla VI-A y Tabla VI-B. Las cepas listadas en las tablas se suministran como ejemplos de cepas de *N. meningitidis*, sin limitación. Las cepas listadas en la Tabla VI-A se clasifican en Subfamilia A de proteína 2086 y las cepas listadas en la Tabla VI-B se clasifican en la Subfamilia B de proteína 2086. Las cepas listadas en cada tabla se agrupan mediante serosubtipos. Las cepas están disponibles de las siguientes cuatro fuentes como se indica en la tabla: MPHL-Manchester Public Health Laboratory, Manchester, UK; RIVM, Bilthoven, Holanda; Universidad de Iowa, College of Medicine, Department of Microbiology, Iowa City, IA; y Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C.

TABLA VI-A

Cepa	Serosubtipo	Fuente
M97 251854	B:4z, PI:4	MPHL
M97 250622	B:2b, PI:10	MPHL
M97 250572	B:2b, PI:10	MPHL
M97 250771	B:4z, PI:14	MPHL
M97 250732	B:4z, PI:14	MPHL
M97 250809	B:15, PI:7,16	MPHL
M97 252697	B:1, PI:6	MPHL
M97 252988	B:4, PI:6	MPHL
M97 252976	B:4, PI:6	MPHL

345

M97 252153	B:4, PI:6	MPHL
M97 253248	B:15, PI:7,NT	MPHL
CDC1610	P1:NT 4(15)	CDC
CDC1521	P1.6,3 2b(4)	CDC
CDC1034	P1.7 4(15)	CDC
L8	P1.7,1 15(4)	Walter Reed
CDC1492	P1.7,1 4(15)	CDC
870446	P1.12a,13	RIVM
CDC2369	P1.(9),14	CDC
6557	P1.(9),14	RIVM
2996	P1.5,2	RIVM
NmB	P1.5,2	UIOWA
L3	P1.5,2	Walter Reed
B16B6	P1.5,2	RIVM
CDC1135		CDC
L5	P1.NT	Walter Reed
L4	PI.21,16	Walter Reed

TABLA VI-B

Cepa	**Serosubtipo**	**Fuente**
M98 250670	B:1, PI:4	MPHL
M98 250024	B:1, PI:4	MPHL
M97 253524	B:1, PI:4	MPHL
M97 252060	B:1, PI:4	MPHL
M97 251870	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251836	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251830	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251905	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251898	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251885	B:4z, PI:4	MPHL

M97 251876	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251994	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251985	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251957	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251926	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252045	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252038	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252026	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252010	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252098	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252083	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252078	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250735	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250797	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250768	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250716	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250699	B:4z, PI:10	MPHL
M98 250393	B:4z, PI:10	MPHL
M98 250173	B:4z, PI:10	MPHL
M97 253462	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250762	B:15, PI:7,16	MPHL
M98 250610	B:15, PI:7,16	MPHL
M98 250626	B:15, PI:7,16	MPHL
M97 250571	B:15, PI:16	MPHL
M97 252097	B:15, PI:16	MPHL
M97 253092	B:1, PI:6	MPHL
M97 252029	B:15, PI:7, NT	MPHL
M97 251875	B:15, PI:7, NT	MPHL
CDC1127	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC982	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC1359	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC798	PI.7,16 15(4)	CDC

CDC1078	PI.7,16 15(4)	CDC
CDC1614	PI.7,16 15(4)	CDC
CDC1658	PI.7,16 15(4)	CDC
H44/76	PI.7,16 15(4)	RIVM
CDC1985	P1.7,13 4(15)	CDC
L6	P1.7,1 ?(4)	Walter Reed
CDC1573	P1.7,1 4(15)	CDC
L7	P1.7,(9),1	Walter Reed
CDC937	P1.7,3	CDC
8529	P1.7,3	RIVM
880049	P1.7b,4	RIVM
CDC2367	P1.15 4(15)	CDC
H355	P1.19,15	RIVM
CDC1343	P1.14 4(15)	CDC
M982	P1.22,9	RIVM
870227	P1.5c,10	RIVM
B40	P1.5c,10	RIVM
5315	P1.5c,10	RIVM
CDC983	P1.5,2	CDC
CDC852	P1.5,2	CDC
6940	P1.18,25(6)	RIVM

Otras cepas están fácilmente disponibles como aislados de los individuos infectados.

Ejemplo 6

Reactividad de antisuero rLP2086 contra cepas meningococal:

La siguiente tabla, la Tabla VII, muestra la capacidad de protección cruzada y reactiva cruzada del rLP2086 como se

describió anteriormente. Como se indica en la Tabla, el rLP2086 fue procesado y analizado al utilizar una variedad de técnicas que incluyen los títulos (WCE) ELISA de célula completa, ensayo bactericida (BCA) y ensayos de Rata Infante (IR) para determinar la reactividad de la superficie celular bacterial de un anticuerpo policlonal elevado contra la proteína 2086.

Reactividad de antisuero rLP2086-8529 contra cepas meningococales múltiples

Cepa	Serosubtipo	WCE	BC	IR
Subfamilia A 2086				
870446	P1.12a,13	808,615	>800	
NmB	P1.5a,2c	47,954	<100	
6557	P1.22a,14[a]	169,479	<25	-
Subfamilia B 2086				
880049	P1.7b,4	1,402,767	100	+
H44/76	P1.7,16	8,009,507	>6400	
H355	P1.19,15	10,258,475	3200	+
6940	P1.18,25(6)	5,625,410	800	
870227	P1.5c,10	4,213,324	<25	+
252097	P1.7b,16	10,354,512	>800	
539/8529	P1.7b,3	11,635,737	3200	
M982	P1.22,9	1,896,800	800	
CDC-1573	P1.7a,1	208,259	25	
CDC-937	P1.7b,(3)	9,151,863	>800	

+mayor de reducción de 10 veces en bacteremia

-menor de reducción de 10 veces en bacteremia

Ejemplo 7

Varias construcciones para expresar la proteína ORF2086 se prepararon. La siguiente tabla, la Tabla VIII, es una tabla de construcción r2086 que se suministra para propósito de mostrar los ejemplos e ilustrar una implementación de la presente invención, sin limitación a ésta.

TABLA VIII

Resumen de Construcción r2086

Construcción	Promotor	Líder	Expresión	Extracción	Vector	Proteína total %
pPX7340	T7	Nativo	Coomassie	Sarcosil soluble	pET27b	Lipoproteína procesada 2,5%
pPX7341	T7	P4	Coomassie	Sarcosil soluble	pET27b	Lipoproteína procesada 5%
pPX7343	Arabinosa	P4	Coomassie	Sarcosil soluble	pBAD18 cm	Lipoproteína procesada 7-10%
pPX7325	T7	Fusión T7-tag/maduro	Coomassie	Cuerpos de inclusión	pET9a	Proteína madura 40-50%
pPX73280	T7	Maduro	Coomassie	Soluble	pET9a	Proteína madura 10%

Ejemplo 8

Estudios adicionales con proteínas de membrana exterior de LOS agotado identificaron cepas adicionales que producen

proteínas de membrana exterior diferentes a PorA que fueron capaces de elicitar anticuerpos bactericidas para cepas que expresan serosubtipos heterólogos. Lo siguiente describe estudios adicionales para identificar proteínas adicionales de acuerdo con una modalidad de la presente invención, y específicamente lipoproteínas de membrana exterior, que puedan reducir el número de proteínas requerido en una composición inmunogénica meningococal. Estos estudios adicionales complementan los estudios descritos en los ejemplos anteriores.

Fraccionamiento subcelular, extracción de detergente diferencial, enfocamiento isoeléctrico, y cromatografía de intercambio de ión se utilizaron en conjunto con ensayos bactericidas e inmunización contra múltiples cepas para identificar grupos pequeños de proteínas de interés. La secuenciación directa de los componentes principales indica que se bloqueo el N-terminal. Las secuencias de proteína internas se obtuvieron mediante secuenciación directa de polipéptidos derivados de digestión química y proteolítica. La secuencia genómica de una cepa meningococal de grupo A fue descargada del Sanger Center y analizado mediante nuestro grupo Bioinformatics que utiliza algoritmos del propietario y existentes para crear una base de datos buscable. Los datos de la secuencia de péptidos indican que el ORF2086 fue de

interés. Los cebadores basados en este ORF se utilizaron para el PCR del gen 2086 de la cepa 8529. El análisis de la secuencia de gen, el hecho de que el N-terminal se bloquea, y su ubicación subcelular indican que el P2086 es una proteína de membrana exterior lipidada (LP2086). El rLP2086-8529 y variantes de otras cepas meningococales se expresaron recombinantemente como lipoproteínas en *E. coli* al utilizar la secuencia de señal P4 de *H. influenzae*. Estas proteínas recombinantes se aislaron de las membranas *E. coli* mediante extracción de detergente diferencial, purificada utilizando cromatografía de intercambio de ión, y utilizada para inmunizar ratones. El suero anti-LP2086 de ratón fue capaz de facilitar la actividad bactericida contra diferentes cepas de serosubtipo de *N. meningitidis*. Ensayos adicionales de los genes P2086 de varias cepas de *N. meningitidis* mostraron que estas secuencias caen en dos grupos designados de Subfamilia A y Subfamilia B (ver FIG. 12). El antisuero elevado contra las proteínas de la Subfamilia B fueron bactericidas contra nueve cepas que expresan proteínas de Subfamilia B, y una cepa que expresa una proteína de subfamilia A. El antisuero de la Subfamilia A fue bactericida contra cepas de Subfamilia A. Una mezcla de un rPorA y un rLP2086 elicitó anticuerpos complementarios que se extienden más alla del cubrimiento de la vacuna que se induce mediante la proteína sola.

Estas observaciones conducen a las siguientes conclusiones. Los antígenos rLP2086 son capaces de elicitar anticuerpos bactericidas contra cepas meningococales que expresan proteínas PorAs heterólogas y P20086 heterólogas. La familia P2086 de antígenos puede ser una vacuna útil o inmunogénico solo o en combinación con otros antígenos neiseriales.

Lo siguiente describe el estudio precedente en detalle. Una mezcla de complejo de proteínas de membrana exterior solubles (sOMPs) se encontró que elicita PorA independiente de anticuerpo bactericida contra cepas que expresan proteínas PorA heterólogas. Un proceso de extracción de detergente diferencial, de enfoque isoeléctrico y cromatografía de intercambio de ión seguido por inmunización de ratón se utilizó para seguir los componentes activos inmunológicamente.

En cada etapa, el suero fue ensayado para reactividad de superficie y actividad bactericida contra varias cepas que contienen antígenos de serosubtipo que son representativos de la epidemiología a nivel mundial de la enfermedad meningococal.

Este proceso de separación e inmunización se utilizó para identificar un candidato inmunogénico reactivo cruzado novedoso para *N. meningitidis* del Grupo B.

La generación de cepas deficientes PorA - El lugar cromosomal PorA fue clonado dentro del plásmido pPX7016 de la cepa 2996. Dentro del plásmido el promotor PorA, la caja S/D y los primeros 38 codones N-terminales han sido eliminados y reemplazados con un cassette de expresión KanR autocontenido. Los plásmidos se linearizaron con enzimas de restricción y transformadas naturalmente en cepas de serosubtipo PI:5,2; PI:9; PI:7,16; PI:15; PI:4; PI:3 y PI:10. Los transformantes resistentes a la canamicina se seleccionaron para la pérdida de PorA mediante serosubtipos específicos monoclonales en un ELISA.

Ensayo Bactericida: Ver Mountzourous, K. T. y Howell, A. P. Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Flourescence-Based Serum Bactericidal Assay for Group B *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2878-2884.

Ensayo Inmunosorbente Ligado a Enzima de Célula Completa (ELISA): Las suspensiones de célula completa de *N. meningitidis* se diluyeron a una densidad óptica de 0,1 en 620

nm en 0,01M de fosfato estéril, 0,137M de NaCl, 0,002M de KCl (PBS). De esta suspensión se agregaron 0,1 mL a cada pozo de placas de 96 pozos Nunc Bac T (Cat#2-69620). Las células se secaron en placas a 37° C durante la noche, luego se cubrieron, se invirtieron y almacenaron a 4° C. Las placas fueron lavadas tres veces con amortiguador de lavado (0,01M Tris-HCl, 0,139M NaCl/KCl, 0,1% Brij-35, pH 7,0-7,4). Se prepararon diluciones de antisuero en PBS, 0,05% Tween-20/Azida y 0,1mL se transfirió a las placas cubiertas e incubó durante dos horas a 37° C. Las placas se lavaron tres veces en amortiguador de lavado. Se diluyó IgG AP de cabra-anti-ratón (Southern Biotech) en 1:1500 en PBS/0,05% Tween-20, 0,1mL se agregó a cada pozo, y las placas se incubaron a 37° C durante dos horas. Las placas se lavaron (como se hizo anteriormente). La solución de sustrato se preparó al diluir fosfato de p-nitrofenil (Sigma) en dietanolamina a 1mg/ml. Se agregó sustrato a la placa en 0,1 mL por pozo e incubó a temperatura ambiente durante una hora. La reacción se detuvo con 50 ul/pozo de 3N de NaOH y las placas se leyeron en 405 nm con 690 nm de referencia.

Inducción de PorA recombinante: Las cepas BLR(DE3)/pET9a se cultivaron durante la noche a 37° C en HySoy Broth (Sheffield Products) complementado con Kan-30 y 2% de glucosa. En la mañana los cultivos de O/N se diluyeron en 1/20 en HySoy

Broth Kan-30 y 1% de glicerol y se cultivaron a 37° C durante 1 hora. Estos cultivos se indujeron mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Los cultivos crecieron durante 2-3 horas adicionales y luego se cosecharon.

Purificación de PorA recombinante: El rPorA fue solubilizado de anticuerpos de inclusión de *E. coli* con 8M de úrea, y replegados mediante diálisis contra amortiguador que no contiene úrea. El rPorA replegado fue luego concentrado mediante diafiltración y el amortiguador intercambiado mediante columna G25 dentro de NaPO4 pH6. El rPorA dializado fue luego ejecutado en una columna de intercambio de catión (S Fractogel) y eluido con 1M de NaCl.

Los sOMPs de la cepa 8529 (P1.7-2,3) elicita actividad bactericida independiente PorA en ratones contra cepas que expresan serosubtipos heterólogos. La siguiente tabla, Tabla IX, muestra la actividad bactericida en las cepas estudiadas.

TABLA IX

Cepa de Ensayo	Serosubtipo	Título[1] BC_{50}
539	P1.7-2,3	1280
539 PorA-	NST[2]	1080
H44/76	P1.7,16	3285

H44/76 PorA-	NST	2620
H355	P1.19,15	>1350
H355 PorA-	NST	>1350
880049	P1.7-2,4	290
880049 PorA-	NST	85
M982	P1.22,9	85
M982 PorA-	NST	<50

Preparación de sOMPs: Se extrajeron membranas de *N. meningitidis* con TX-100, Zwittergente 3-14, y Zwittergente 3-14+0,5M NaCl. El sOMPs referido anteriormente se solubilizó en el extracto de Zwittergente 3-14/0,5M NaCl. La extracción se desarrolló al utilizar técnicas bien conocidas por aquellas personas expertas en la técnica, por ejmplo, ver Patente Estadounidense No. 6,355,253 que se incorpora aquí como referencia.

Inmunogenicidad: Ratones Swiss-Webster hembras se inmunizaron con 25 ug de proteína total adyuvada con 20 ug QS-21 en la semana 0 y 4. Un sangrado y análisis de datos se hizo en la semana 6.

Un título bactericida (BC_{50}) representado como el recíproco de la dilución de antisuero que reduce el conteo de células viables al 50%. El suero de ratón normal en la semana 0 tuvi títulos BC_{50} de <25.

2 NST=No Serosubtipificable

La siguiente tabla, Tabla X, muestra el resumen de purificación y caracterización para P2086 lipidado recombinante (rLP2086) para ambas Subfamilia A y Subfamilia B.

Purificación de rLP2086 de Subfamilia A

TABLA X

Variante rLP2086	Homología A.A. (%)[1]	pI Teórico	Pureza (%)[2]
870446	75	6.1	80
2996	71	5.9	95
M97 252988	71	6.3	96
C11	68	6.4	82
M98 250771	62	6.1	83

Purificación de rLP2086 de Subfamilia B

TABLA XI

Variante rLP2086	Homología A.A. (%)[1]	pI Teórico	Pureza (%)[2]
8529	100	7.5	96

M982	94	6.3	96
88049	92	6.2	90
CDC1573	87	5.6	93

Método de Purificación: Todas las variantes se solubilizaron a partir de membranas *E. coli* con TX-100 (excepto rLP2086-8529 que se solubilizó con Sarcosil o Úrea). Se alcanzó una purificación adicional con una combinación de intercambio de anión (TMAE), cromatografía de intercambio de catión y/o exclusión de tamaño (S Fractogel) en un amortiguador Tris-HCl o NaPO4.

1 Homología de aminoácido según se comparó con P2086 de la cepa 8529

2 Pureza según se determinó mediante SDS-PAGE y densitometría láser de banda de teñido Coomassie coloidal (Simplemente teñido Azul)

Inmunogenicidad de un miembro de Subfamilia B, rLP2086-8529, ensayado contra cepas homólogas y heterólogas.

La Tabla XII adelante muestra la inmunogenicidad de un miembro de Subfamilia B, rLP2086-8529, ensayado contra cepas homólogas y heterólogas.

TABLA XII

Cepa objetivo	Subfamilia P2086	Serosubtipo de cepa objetivo	Homología[a] A.A.	Título ELISA[b] de Célula Completa	Título[c] BC_{50}
539	B	P1.7-2,3	100	>1,458,000	3,200
H44/76	B	P1.7,16	100	>1,458,000	3,200
H355	B	P1.19,15	100	>1,458,000	3,200
CDC937	B	P1.7-2,3-4	100	>1,458,000	>800
M97 252097	B	P1.7-2,16	100	>1,458,000	>800
870227	B	P1.5-2,10	100	>1,458,000	<25
6940	B	P1.18,25,6	97	900,162	>800
M982	B	P1.22,9	94	435,909	200
880049	B	P1.7-2,4	92	349,912	400
CDC1573	B	P1.7-1,1	87	102,508	25
870446	A	P1.12-1,13	71	389,829	800
M98 250771	A	P1.22,14	62	139,397	<25
NmB	A	P1.5-1,2-2	71	<2,000	<25

Procedimiento de Vacunación: Ratones Swiss-Webster hembras de 6-8 semanas de edad se inmunizaron con 10 ug de rLP2086-8529+20ug QS-21 en la semana 0 y la semana 4. El análisis de los datos se desarrolló en la semana 6 luego de sangrado.

a Homología de aminoácido de P2086 según se comparó con rLP2086-8529

b Títulos de punto de extremo expresados como el recíproco de la dilución en absorbancia = 0,1

c Títulos BC50 representados como el recíproco de la dilución de antisuero que reduce el conteo de células viables al 50%. El suero de ratón normal a la semana 0 tuvo títulos BC50 de <10

La Tabla XIII muestra la inmunogenicidad de un miembro de Subfamilia B, rLP2086-2996, ensayado contra cepas homólogas y heterólogas.

TABLA XIII

Cepa objetivo	Subfamilia P2086	Serosubtipo de cepa objetivo	Homología[a] A.A.	Título ELISA[b] de Célula Completa	Título[c] BC_{50}
NmB	A	P1.5-1,2-2	99.6	8,979	<25
870446	A	P1.12-1,13	99	>1,458,000	>800
M97 252697	A	P1.18,25,6	98	320,732	>800
6557	A	P1.22-1,14-1	98	17,319	<25
M98 250732	A	P1.22,14-1	89	241,510	>800
M98 250771	A	P1.22,14	89	447,867	800
H44/76	B	P1.17,16	72	56,386	<25

Procedimiento de Vacunación: Ratones Swiss-Webster hembras de 6-8 semanas de edad se inmunizaron con 10 ug de rLP2086-2996+20ug QS-21 en la semana 0 y la semana 4. El análisis de los datos se desarrolló en la semana 6 luego de sangrado.

a Homología de aminoácido de P2086 según se comparó con rLP2086-2996

b Títulos de punto de extremo expresados como el recíproco de la dilución en absorbancia = 0,1

c Títulos (BC50) bactericidas representados como el recíproco de la dilución de antisuero que reduce el conteo de células viables al 50%. El suero de ratón normal a la semana 0 tuvo títulos BC50 de <10

La Tabla XIV de adelante muestra que el antisuero para el rLP2086 y rPorA son complementarios cuando se mezclan y ensayan para actividad bactericida.

TABLA XIV

Antisuero	H44/76 (P1.7,16)	NMB (P1.5-1,2-2)	880049 (P1.7-2,4)	H355 (P1.19,15)	870227 (P1.5-2,10)	6557 P1.22-1,14-1)
Anti-rLP2086+tres	>3,200	>800	200	>800	200	200

antisueros rPórA						
Controles						
Anti-rLP2086	6,400	<25	100	3,200	<25	<25
Antisuero rPorA monovalente correspond.	-	1,600	-	-	200	400

Procedimiento de Vacunación: Ratones Swiss-Webster hembras de 6-8 semanas de edad se inmunizaron con 10 ug de rLP2086-8529/20ug QS-21, o 15 ug de rPorA/100 ug de MPL en la semana 0 y la semana 4. El análisis de los datos se desarrolló en la semana 6 luego de sangrado.

a Títulos (BC50) bactericidas representados como el recíproco de la dilución de antisuero que reduce el conteo de células viables al 50%. El suero de ratón normal a la semana 0 tuvo títulos BC50 de <10.

La siguiente tabla, la Tabla XV, muestra que las mezclas de las Subfamilias de rLP2086 y dos rPorAs elicitan anticuerpos bactericidas en ratones.

TABLA XV

	H44/76	6940	880049	N982	N98 250771	M98 250732	M97 252697	870446	NmB	6557
	SfB[b]	SfB	SfB	SfB	SfA[b]	SfA	SfA	SfA	SfA	SfA

	P1.7,16	P1.18 25,6	P1.7-2,4	P1.22, 9	P1.22, 14	P1.22,14-1	P1.18,25,6	P1.12-1,13	P1.5-1,2-2	P1.22-1,14-1
Antígeno										
rLP2086-8529 + rLP2086-2996	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	-	<25
rLP2086-8529 + rLP2086-2996 + rP1.5-1,2-2 + rP1.22-1,14-1	>800	800	100	200	400	400	>800	>800	>800	200
Controles[c] Mono-valentes	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	>800	800

Procedimiento de Vacunación: Ratones Swiss-Webster hembras de 6-8 semanas de edad se inmunizaron con 10 ug de cada proteína + 20ug QS-21 en la semana 0 y la semana 4. El análisis de los datos se desarrolló en la semana 6 luego de sangrado.

a Títulos (BC50) bactericidas representados como el recíproco de la dilución de antisuero que reduce el conteo de células viables al 50%. El suero de ratón normal a la semana 0 tuvo títulos BC50 de <10.

b Subfamilia A - SfA, Subfamilia B - SfB

c Control monovalente relevante: antisuero de rLP2086-8529, rLP2086-2996, rP1.5-1,2-2 o rP1.22-1,14-1.

Lo siguiente resume los resultados de los estudios descritos anteriormente. El antisuero de anti-rLP2086 es bactericida contra 13/16 cepas de ensayo. Once cepas que expresan diferentes serosubtipos se asesinan mediante el suero anti-P2086. La actividad bactericida del suero anti-rLP2086 es complementaria para el suero anti-rPorA. Mezclas de P2086 y PorA elicitan anticuerpos bactericidas complementarios en ratones. La extracción de detergente diferencial, purificación e inmunización en conjunto con un ensayo de anticuerpo funcional contra muchas cepas se puede utilizar para identificar nuevos candidatos de vacunas. El P2086 se ha identificado como un candidato de vacuna que elicita anticuerpo bacterial contra cepas heterólogas en P2086 y rPorA. Así, la familia 2086 de proteínas puede ser una vacuna útil ya sea sola o en combinación con otros antígenos neiseriales.

Ejemplo 9

De acuerdo con los ejemplos previos, la cepas meningococales adicionales, de serogrupos variantes, se seleccionaron mediante PCR para la presencia del gen ORF2086. Finalmente,

cien cepas meningococales se seleccionaron. Lo siguiente describe el estudio y sus resultados generales. Estos resultados complementan los datos de los ejemplos anteriores.

Dos conjuntos de cebadores PCR internos específicos para las regiones variables C-terminal se utilizaron para discriminar entre las secuencias de gen de Subfamilia A y B. La presencia de un producto amplificado PCR de aproximadamente 350 bp indica que la secuencia de gen 2086 está presente en el cromosoma. Todas las cepas produjeron un producto PCR sencillo del tamaño esperado. Se determinaron las secuencias de nucleótido de cincuenta y cinco genes ORF 2086 de longitud total, alineados (Enastar MegAlign) y utilizado para generar un árbol filogenético. (Ver FIG. 12).

Nueve de estos genes 2086 fueron expresados recombinantemente como una lipoproteína rLP2086 en un sistema promotor inducible por arabinosa pBAD y tres de estos genes fueron expresados recombinantemente como una proteína no lipidada rP2086 en un sistema pET inducible IPTG. Estas proteínas recombinantes se expresaron en B de *E. coli*. La proteína recombinante purificada se utilizó para inmunizar ratones y el antisuero de ratón se ensayo para sus títulos IgG de suero y su actividad bactericida contra una variedad de cepas meningococales heterólogas.

Se amplificó el ORF2086 mediante PCR de uno de los siguientes, células meningococales completas, ADN cromosomal purificado o plantillas de ADN de plásmido.

Nueve de los genes ORF 2086 se clonaron en el vector pLP339, que fusiona la secuencia líder P4 *Haemophilus* al extremo 5' de los genes ORF2086. Se utilizó la cepa BLR de *E. coli* como la cepa huésped para la expresión recombinante de la forma lipidada de rP2086 de los clones pBAD/ORF 2086. (Ver FIG. 10A). El promotor inducble de arabinosa pBAD conduce la expresión de la proteína de fusión de señal P4/ORF 2086 para expresar una forma lipidada de rP2086. Tres genes P2086, que carecen de una secuencia de señal, se clonaron en un vector pET9a detrás del promotor fago T7 altamente activo. La cepa BL21(DE3) de *E. coli* se utilizó como la cepa huésped para la expresión recombinante de una forma no lipidada de ORF2086 de los clones pET9a/ORF 2086 (ver FIG. 10B). El lisogen DE3 en la cepa BL21 de *E. coli* se puede incluir para expresar la polimerasa T7 ARN de acuerdo con el control del promotor lacUV5 mediante la adición de IPTG. Ver, WCE, FEMS Micro. Lett., 48 (1987) 367-371 y BCA; J. Cllin. Microbiol., 38 (2000) 2878-2884.

El gen, ORF2086, se clonó y secuenció desde cincuenta y cinco cepas de *N. meningitidis* diferentes. Las secuencias de nucleótidos se alinearon (Enastar MegAlign) y se utilizaron para generar un árbol filogenético (Ver FIG. 12). Este árbol revela dos subfamilias distintas de la secuencia de nucleótido de gen ORF2086. Las dos subfamilias de genes son similares en sus extremos 5', pero contienen considerable variación cerca de sus extremos 3'. Aunque parece ser significativamente variable, ciertas regiones claves del gen son altamente homólogas entre las diferentes cepas. Estas regiones conservadas pueden suministrar continuidad funcional para la proteína y pueden ser indicadoras de epitopes protectores cruzados para ser explotados como objetivos de vacuna.

El gen 2086 se clonó de varias cepas meningococales de serogrupo B y se expresaron con y sin la secuencia de señal de lipidación. Con referencia a las FIG. 11A y 11B, las fotografías de gel muestran los lisatos de célula completos de B *E. coli* que expresan la proteína r2086. La forma no lipidada fusionada al T7-Tag expresado en el nivel más alto. La secuencia T7-Tag puede suministrar estabilidad al mARN y mejora significativamente los niveles de polipéptido traducido. Esta proteína de fusión parece depositar en cuerpos de inclusión y puede ser purificada y replegada

fácilmente con protocolos conocidos. Las formas lipidadas y no lipidadas de P2086 se expresan en aproximadamente 5 a 8% de la proteína celular total, con la excepción de las fusiones T7-Tag, que expresa rP2086 como aproximadamente 50% de la proteína total. La forma no lipidada de la proteína parece ser soluble y localizada en el citoplasma. La forma lipidada de la proteína parece estar asociada con las fracciones de membrana y se solubiliza con detergente.

La proteína 2086 lipidada recombinante de la cepa 8529 B de *N. meningitidis* elicita consistentemente títulos IgG de suero mayores que la forma no lipidada (ver Tabla XVI adelante), que se correlaciona bien con el nivel mejorado de actividad bactericida contra ambas cepas meningococales homólogas y heterólogas (ver Tabla XVII adelante). La proteína en su forma lipidada nativa puede tener estructura terciaria superior para presentación y/o el lípido adherido puede actuar como un adyuvante que estimula una actividad inmunogénica mayor.

TABLA XVI

Respuesta Inmune Elicitada en la Semana 6 mediante WCE utilizando 8529 rP2086 (no lipidada) vs. 8529 rLP2086 (lipidada)

Suero de Ratón		Cepas Meningococales				
Antígeno	Adyuvante	H44/76	H355	870227	880049	870446

(10 ug)	(20 ug)					
rP2086	QS-21	273,238	212,947	102,694	69,124	21,446
rLP2086	QS-21	5,384,306	4,819,061	2,930,946	1,307,091	886,056

TABLA XVII

8529 rP2086 Elicita la Actividad Bactericida Más Débil que 8529 rLP2086

Suero de Ratón		Cepas Meningococales			
Antigeno (10 ug)	Adyuvante (20 ug)	H44/76	H355	880049	NMB
rP2086	QS-21	200	100	<25	<25
rLP2086	QS-21	6,400	3,200	100	<25
Pre-inmune	-	<10	<10	<10	<10
Control positivo	-	1,600	100	200	1,600

El siguiente es un resumen de los resultados del estudio. Todas las cepas B de *N. meningitidis* ensayadas parecen tener un gen similar al 2086. Al menos dos familias del gen 2086 están representadas: Subfamilia A - aproximadamente 30% de las cepas y Subfamilia B aproximadamente 70% de las cepas. El gen 2086 se ha clonado y secuenciado de 55 cepas de *N. meningitidis*. Las secuencias dentro de la Subfamilia A son ~86-100% idénticas en el nivel de ADN. Las secuencias dentro de la Subfamilia B son ~89,5-100% idénticas al nivel de ADN. Las secuencias dentro de la Subfamilia A vs. Subfamilia B son ~60,9-74% idénticas en el nivel de ADN. Los homólogos 2086

han sido identificados mediante selección PCR en lo siguiente:

N. meningitidis A, B, C, W135, Y

N. lactamica

N. gonorrhoeae FA1090

Varios genes ORF2086 han sido clonados y expresados recombinantemente.

Las versiones lipidadas de P2086 se expresaron de nueve cepas meningococales.

Estas proteínas recombinantes han sido purificadas y utilizadas para vacunar ratones.

El antisuero resultante es bactericida.

Las versiones no lipidadas de P2086 se expresaron de tres de las nueve cepas anteriores.

El rLP2086 elicita consistentemente una respuesta inmune mayor que el rP2086.

El rLP2086 también exhibe actividad bactericida mejorada contra ambas cepas meningococales homóloga y heteróloga.

Ejemplo 10

Las siguientes tablas, Tabla XVIII y XIX, muestran la caracterización de variantes de miembros de las dos subfamilias.

TABLA XVIII

Variantes de rLP2086 de Subfamilia A - Caracterización

		rLP2086 252988	rLP2086 250771	rLP2086 870446	rLP2086 2996	rLP2086 C11
Medio de Crecimiento		HySoy	HySoy	HySoy	HySoy	HySoy
Solubilidad		rTX-100 ⇒ Z3-12	TX-100	TX-100	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12
Etapas de Purificación		TMAE S Fractogel SEC	HQ Poros SEC	HQ Poros SEC	TMAE SEC	TMAE S Fractogel
Pureza (%)		96	83	80	95	82
Rendimiento(mg/g pastilla célula)		0.2	0.7	0.8	0.5 (Fermentador)	0.1
Tamaño	SEC(Z3-12)	134,000	155,000	132,000	163,000	126,000
	MB	27,897 (lípido 712)	-	-	27,878 (lípido 750)	28,139 (lípido 682)
Punto Medio de Transición de Desnaturalización térmica (T_m)° C		66° C	-	NT	65° C	63° C
Proteína Disponible (mg)		2.7 mg	1 mg (Z3-12)	5.0 mg	44 mg	1.1 mg
Homología de Secuencia 8529 (%)		71	62	71	72	68

TABLA XIX

Variantes de rLP2086 de Subfamilia B - Caracterización

		rLP2086 8529	rLP2086 M982	rLP2086 880049	rLP2086 CDC1573
Medio de Crecimiento		Apollon (Sanford)	Apollon	HySoy	HySoy
Solubilidad		4M Urea⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100
Etapas de Purificación		TMAE S Fractogel	TMAE S Fractogel	TMAE S Fractogel	TMAE SEC
Pureza (%)		96	96	90	93
Rendimiento(mg/g pastilla célula)		0.2 (Fermentador)	1.6 (fermentador)	0.4	1.0
Tamaño	SEC(Z3-12)	95,000	110,000 150,000	100,000	120,000
	MS	27,785 (lípido 822)	27,719 (lípido 711)	28,044 (lípido 819)	28,385 (lípido 823)
Punto Medio de Transición de Desnaturalización térmica (T_M)° C		70° C	75° C	62° C	NT
Proteína Disponible (mg)		Urea-34mg. Sarc-36mg	Fuente 1-47mg Fuente 2-17mg	3.6 mg	4.9 mg
Homología de Secuencia 8529 (%)		100	94	92	87

La Tabla XX adelante suministra los resultados de los ensayos bactericidas de suero fluorescente para la Subfamilia A 2086.

TABLA XX

Descripción	250771	870446	6557	NMB	M98 250732	M97 252697

rLP2086-252988, 10 µg	>800 (99%)*	>800 (99%)*	<25	-	>800 (99%)*	>800 (93%)*
rLP2086-C11, 10 µg	200	>880 (91%)*	<25	-	200	400
rLP2086-250771, 10µg	>800 (92%)*	>800 (99%)*	<25	-	>800 (96%)*	>800 (84%)*
rLP2086-870446, 10 µg	400	>800 (99%)*	<25	-	400	400
rLP2086-2996, 10 µg	800	>800 (99%)*	<25	-	>800 (93%)*	>800 (72%)*
rLP2086-8529+ rLP2086-2996, 10 µg	800	>800 (99%)*	<25	-	>800 (80%)*	>800 (72%)*
rLP20868529+ rP1.22a,14a+ rP1.5a,2c, 10 µg	-	800	200	>800 (98%)*	-	-
rLP2086-8529+ rLP2086-2996+ rP1.22a,14a+ rP1.5a,2c, 10 µg	400	>800 (99%)*	200	>800 (99%)*	400	>800 (88%)*
NMB/rLP2086-8529 Vesiculas, 20µg	-	100	-	400	-	-
rP1.22a,14a, 10µg	25	-	800	-	100	-
rP1.5a,2c, 10 µg	-	-	-	>800 (99%)*	-	-
rLP2086-8529, 10µg	-	800	-	-	-	-
rP1.22a,14a, 25µg	200	-	-	-	800	-
rP1.18,25.6, 5µg	-	-	-	-	-	
nP1.22,9(M982), 25µg	-	-	100	-	-	-

Suero de ratón preinmune (control negativo)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	800	400	800	1600	**	**

Notas:

*El porcentaje indica el % de actividad BC en la dilución 1:800.

**Control positivo no disponible.

-Suero no ensayado

Ejemplo 11

Lo siguiente demuestra adicionalmente que el P20806 se expresa en cepas neiseriales y suministra ejemplos específicos adicionales de la expresión P2086 en varias cepas.

Los lisatos de las células se preparan con células a partir de cultivos de placa resuspendidos en amortiguador de muestra SDS y se calientan a 98° C durante cuatro minutos. Las muestras se cargan en ~30-50 ug de proteína total por pozo en 10-20% de gel pre-cast (ICN) y corridas a 175V. Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa, que fue luego bloqueada durante 30 min. con 5% de leche en polvo en solución salilna Tris-amortiguada (Blotto). El anticuerpo primario utilizado fue una fuente de antisuero policlonal elevando contra variantes rLP2086 individuales en ratones.

Con referencia a las FIG. 17 y 18, un análisis Western Blot muestra la reactividad del antisuero de ratón rLP2086 para los lisatos de célula completa de la Subfamilia A y B de P2086. Para la mancha de lisato de célula de Subfamilia A, el antisuero utilizado fue elevado contra rLP2086-2996, -870446 y -250771 con rLP2086-250771 diluido en 1/500 en Blotto y los otros diluidos en 1/1000 en Blotto. Para la mancha de lisato de célula de la Subfamilia B, el antisuero utilizado se elevó contra rLP2086-8529 (diluido 1/1000 en Blotto), -CDC1573, -M982 y -880049 (estos tres diluidos 1/500 en Blotto). La mancha y el antisuero primario se incubaron a 4° C durante la noche. La mancha se lavó, se agregó un antisuero cabra-anti-ratónAP secundario en 1/500 en Blotto, y la mancha se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar, la mancha se desarrolló utilizando el Sistema de Sustrato de Fosfato de Membrana BCIP/NBT (KPL).

BIBLIOGRAFÍA

Las referencias citadas aquí anteriormente se anotan adelante y son incorporadas aquí como referencia en su totalidad:

1. 1997. Case definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance. CDC.

2. 1995 Sambrook, J. y D. W. Russell. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

3. 1994. Griffin, A. M. y Griffin, H. G., ed., Computer Analysis of Sequence Data, Part I. Humana Press, New Jersey.

4. 1993. Smith, D. W. ed., Biocomputing: Informatics and Genome Projects. Academic Press, Nueva York

5. 1991. Gribskov, M. y Devereux, J., ed. Sequence Analysis Primer. Stockton Press, Nueva York.

6. 1988. Lesk, A. M., ed. Computational Molecular Biology. Oxford University Press, Nueva York.

7. Abdillahi, H., y J. T. Poolman. 1988. Neisseria menitigitidis group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. Microbial Pathogenesis 4 (1): 27-32.

8. Achtman, M. 1995. Epidemic spread and antigenic variability of Neisseria nzeningitidis. Trends in Microbiology 3 (5): 186-92.

9. Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Cannel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori [published erratum appears in Nature 1999 Feb 25; 397 (6721): 719]. Nature. 397: 176-80.

10. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-402.

11. Anderson, T. F. 1951. Techniques for the preservation of three- dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans N Y Acad Sci. 13: 130-134.

12. Ambrosch, F., G. Wiedermann, P. Crooy, and A. M. George. 1983. Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent meningococal polysaccharide vaccine. Bulletin of the World Health Organization 61 (2): 317-23.

13. Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res. 27: 573-80.

14. Carillo, H., D. Lipman, and J. Siam. 1988. Applied Math 48: 1073.

15. Chen, C. C., y P. P. Cleary. 1989. Cloning and expression of the streptococcal C5a peptidase gene in Escherichia coli: linkage to the type 12 M protein gene. Infect. Immun. 57: 1740-1745.

16. Chmouryguina, I., A. Suvorov, P. Ferrieri, y P. P. Cleary. 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. Infect. Imbu71. 64: 2387-2390.

17. Cockerill, F. R., 3rd, R. L. Thompson, J. M. Musser, P. M. Schlievert, J. Talbot, K. E. Holley, W. S. Harmsen, D. M. Ilstrup, P. C. Kohner, M. H. Kim, B. Frankfort, J. M. Manahan, J. M. Steckelberg, F. Roberson, y W. R. Wilson. 1998. Molecular, serological, y clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease. Southeastern Minnesota Streptococcal Working Group. Clin Infect Dis. 26: 1448-58.

18. Courtney, H. S., Y. Li, J. B. Dale, y D. L. Hasty. 1994. Cloning, sequencing, y expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. Iiifect Immuiz. 62: 3937-46.

19. Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, y A. Elofsson. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. Protein Engineering. 10: 673-6.

20. Cunningham, M. W., y A. Quinn. 1997. hnmunological crossreactivity between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. Adv Exp Med Biol. 418: 887-92.

21. Dale, J. B., R. W. Baird, H. S. Courtney, D. L. Hasty, y M. S. Bronze. 1994. Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid. Jlnfect Dis. 169: 319-23.

22. Dale, J. B., M. Simmons, E. C. Chiang, y E. Y. Chiang. 1996. Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine. Vaccine. 14:944- 8.

23. Dale, J. B., R. G. Washburn, M. B. Marques, y M. R. Wessels. 1996. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. InfectImmun. 64: 1495-501.

24. Eddy, S. R. 1996. Hidden Markov models. Cur Opiii Struct Bio. 6: 361-5.

25. Ellen, R. P., y R. J. Gibbons. 1972. M protein-associated adherence of Streptococcus pyogenes to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. Infect Immun. 5: 826-830.

26. Eng, J. K., A. L. McCormack, y J. R. Yates, 3rd. 1994. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid- sequences in a protein database. Am Soc Mass Spectrometry. 5: 976-89.

27. Fischetti, V. A., V. Pancholi, y O. Schneewind. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram- positive cocci. Mol Microbiol. 4: 1603-5.

28. Fogg, G. C., y M. G. Caparon. 1997. Constitutive expression of fibronectin binding in Streptococcus pyogenes as a result of anaerobic activation of rota. JBacteriol. 179: 6172-80.

29. Foster, T. J., y M. Hook. 1998. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. 6: 484-8.

30. Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J.

31. Gocayne, J. C. Venter, y et al. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi [see comments]. Nature. 390: 580-6.

32. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, y M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. 1. The role of humoral antibodies. Journal of Experimental Medicine 129 (6): 1307-26.

33. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, y M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. Journal ofExperifnental Medicine 129 (6): 1327-48.

34. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, y M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococal polysaccharides in human volunteers. Journal of Experimental Medicine 129 (6): 1367-84.

35. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, y M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococal group C polysaccharide on the carrier state. Journal of Experimental Medicine 129 (6): 1385-95.

36. Green, B. A., Farley, J. E., Quinn-Dey, T., Deich, R. A., y Zlotnick, G. W. 1991. The e (P4) Outer Membrane Protein of Haemophilus influenza: Biologic Activity of Anti-e Serum and Cloning and Sequencing of the Structural Gene. Infect. Immun. 59: 3191-3198.

37. Guzman, L-M, Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J. 1995. Tight Regulation, Modulation, y High-Level Expression by Vectors Containing the ArabinosePBADPromoter. J. Bacteriology 177: 4121-4130.

38. Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, y H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria:

structure, function and impact on microbial evolution. Mol Microbiol. 23: 1089-97.

39. Hanski, E., y M. Caparon. 1992. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesion of the group A streptococcus Streptococcus pyogenes. Proc Natl Acad Sci., USA. 89: 6172-76.

40. Hanski, E., P. A. Horwitz, y M. G. Caparon. 1992. Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of Streptococcus pyogenes JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. Infect Immun. 60: 5119-5125.

41. Hernandez-Sanchez, J., J. G. Valadez, J. V. Herrera, C. Ontiveros, y G. Guarneros. 1998. lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA. EMBO Journal. 17: 3758-65.

42. Huang, T. T., H. Malke, y J. J. Ferretti. 1989. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in Escherichia coli, y sequence analysis. Mol Microbiol. 3: 197-205.

43. Hynes, W. L., A. R. Dixon, S. L. Walton, y L. J. Aridgides. 2000. The extracellular hyaluronidase gene (hylA) of Streptococcus pyogenes. FEMS MicrobiolLett. 184: 109-12.

44. Hynes, W. L., L. Hancock, y J. J. Ferretti. 1995. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from

Streptococcus pyogenes: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. Infect Immun. 63: 3015-20.

45. Isberg, R. R., y G. Tran Van Nhieu. 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. Trends Microbio. 2: 10-4.

46. Jones, K. F., y V. A. Fischetti. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci. JExp Med. 167: 1114-23.

47. Kihlberg, B. M., M. Collin, A. Olsen, y L. Bjorck. 1999. Protein H, an antiphagocytic surface protein in Streptococcus pyogenes. Infect Immun.
67: 1708-14.

48. Koebnik, R. 1995. Proposal for a peptidoglycan-associating alpha- helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins [letter; comment]. Molecular Microbiology. 16: 1269-70.

49. Kuipers, O. P., H. J. Boot, y W. M. de Vos. 1991. Improved site- directed mutagenesis method using PCR. Nucleic Acids Res. 19: 4558.

50. Kyte, J., y R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Molecular Biology 157: 105-132.

51. Landt, O., H. P. Grunert, y U. Hahn. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. Gene 96: 125- 128.

52. Loessner, M. J., S. Gaeng, y S. Scherer. 1999. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of Staplaylococcus aureus bacteriophage 187. JBacteriol. 181: 4452-60.

53. Lukashin, A. V., y M. Borodovsky. 1998. GeneMark. hmm: new solutions for gene finding. Nucleic Acids Res. 26: 1107-15.

54. Lukomski, S., C. A. Montgomery, J. Rurangirwa, R. S. Geske, J. P. Barrish, G. J. Adams, y J. M. Musser. 1999. Extracellular cysteine protease produced by Streptococcus pyogenes participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. Infect Immun. 67: 1779-88.

55. Madore, D. V. 1998. Characterization of immune response as an indicator of Haemophilus influefzzae type b vaccine efficacy. Pediatr Infect Dis J. 17: S207-10.

56. Matsuka, Y. V., S. Pillai, S. Gubba, J. M. Musser, y S. B. Olmsted. 1999. Fibrinogen cleavage by the Streptococcus pyogenes extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity. Infect Inzmun. 67: 4326-33.

57. Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That, y O. Schneewind. 1999. Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. Science. 285: 760-3.

58. McAtee, C. P., K. E. Fry, y D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of Helicobacter pylori by"proteome" technologies. Helicobacter. 3: 163-9.

59. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. Chow, y D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of Helicobacter pylori by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, y serum profiling. Clin Diagn Lab Immunol. 5: 537-42.

60. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. P. Chow, y D. E. Berg. 1998. Characterization of a Helicobacter pylori vaccine candidate by proteome techniques. J Chrofnatogr B Biomed Sci Appl. 714: 325-33.

61. Mejlhede, N., J. F. Atkins, y J. Neuhard. 1999. Ribosomal-1 frameshifting during decoding of Bacillus subtilis cdd occurs at the sequence CGA AAG. J Bacteriol. 181: 2930-7.

62. Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, y G. S. Chhatwal. 1997. The fibronectin-binding protein of Streptococcus pyogenes, Sfbl, is involved in the

internalization of group A streptococci by epithelial cells. Infect Immun. 65: 1357-63.

63. Mountzouros, K. T., y A. P. Howell. 2000. Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence- based serum bactericidal assay for group B Neisseria meningitidis. J. Cliya. Microbiol. 38 (8): 2878-2884.

64. Nakai, K., y M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. Proteins. 11: 95-110.

65. Navarre, W. W., y O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram- positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev. 63: 174-229.

66. Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, y G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering. 10: 1-6.

67. Nizet, V., B. Beall, D. J. Bast, V. Datta, L. Kilburn, D. E. Low, y J. C. De Azavedo. 2000. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. Infect Inzmun. 68: 4245-54.

68. Nordstrand, A., W. M. McShan, J. J. Ferretti, S. E. Holm, y M. Norgren. 2000. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of

group A streptococcal strain NZ131. Infect Immun. 68: 1019-25.

69. Olmsted, S. B., S. L. Erlandsen, G. M. Dunny, y C. L. Wells. 1993. High-resolution visualization by field emission scanning electron microscopy of Enterococcus faecalis surface proteins encoded by the pheromone-inducible conjugative plasmid pCF10. JBacteriol. 175: 6229-37.

70. Park, J., y S. A. Teichmann. 1998. DIVCLUS: an automatic method in the GEANFAMMER package that finds homologous domains in single- and multi-domain proteins. Bioinfo7matics. 14: 144-50.

71. Parkhill, J., M. Achtman, K. D. James, S. D. Bentley, C. Churcher, S. R. Klee, G. Morelli, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. M. Davies, P. Davis, K. Devlin, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, K. Mungall, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Spratt, y B. G. Barrell. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of Neisseria meningitidis Z2491 [see comments]. Nature. 404: 502-6.

72. Pierschbacher, M. D., y E. Ruoslahti. 1987. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. JBiol Chem. 262: 17294-8.

73. Pizza, M., V. Scarlato, V. Masignani, M. M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G. T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, C. L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broeker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D. W. Hood, A. C. Jeffries, N. J. Saunders, D. M. Granoff, J. C. Venter, E. R. Moxon, G. Grandi, y R. Rappuoli. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science 287 (5459): 1816-20.

74. Podbielski, A., A. Flosdorff, y J. Weber-Heynemann. 1995. The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes. Infect Immun. 63: 9-20.

75. Poolman, J. T. 1996. Bacterial outer membrane protein vaccines. The meningococal example. Advances in Experimental Medicine & Biology 397: 73-7.

76. Proft, T., S. Louise Moffatt, C. J. Berkahn, y J. D. Fraser. 1999. Identification and Characterization of Novel Superantigens from Streptococcus pyogenes. JExp Med. 189: 89-102.

77. Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol Rev. 57: 50-108.

78. Quinn, A., K. Ward, V. A. Fischetti, M. Hemric, y M. W.
Cunningham. 1998. Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. Infect Immun. 66: 4418-24.

79. Reda, K. B., V. Kapur, D. Goela, J. G. Lamphear, J. M. Musser, y R. R. Rich. 1996. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of ssa within Streptococcus pyogenes. Infect Imniun. 64: 1161-5.

80. Sambrook, J., y D. W. Russell. 2001. Molecular cloning a laboratory manual, Third ed, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

81. Salzberg, S. L., A. L. Delcher, S. Kasif, y O. White. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. Nucleic Acids Res. 26: 544-8.

82. Saukkonen, K., H. Abdillahi, J. T. Poolman, y M. Leinonen. 1987. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of Neisseria meningitidis B: 15: P1. 16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. Microbial Patlzogenesis 3 (4): 261-7.

83. Sedegah et al. 1994. Immunology. 91,9866-9870.

84. Sonnenberg, M. G., y J. T. Belisle. 1997. Definition of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate proteins by

two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, y electrospray mass spectrometry. Infect Immun. 65: 4515-24.

85. Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy, y R. Durbin. 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. Proteins. 28: 405-20.

86. Stevens, D. L. 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, y new concepts in treatment. EmergI7tfect Dis. 1: 69-78.

87. Stockbauer, K. E., L. Magoun, M. Liu, E. H. Burns, Jr., S. Gubba, S. Renish, X. Pan, S. C. Bodary, E. Baker, J. Coburn, J. M. Leong, y J. M. Musser. 1999. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A streptococcus with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins alphavbeta3 and alphaIIbbeta3 Proc Natl Acad Sci., USA. 96: 242-7.

88. Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmami, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G.

Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, y J. C. Venter. 2000. Complete genome sequence of Neisseria meningitidis serogroup B strain MC58. Science 287 (5459): 1809-15.

89. Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, y O. Schneewind. 1999. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of Staphylococcus aureus at the LPXTG motif. Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 12424-12429.

90. von Heinje, G. 1987. Sequence Analysis in Molecular Biology. Academic Press, Nueva York.

91. Weldingh, K., I. Rosenkrands, S. Jacobsen, P. B. Rasmussen, M. J. Elhay, y P. Andersen. 1998. Two-dimensional electrophoresis for analysis of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. Itifect Immun. 66: 3492-500.

92. Wolff et al. 1990. Science. 247,1465-1468.

93. Yutsudo, T., K. Okumura, M. Iwasaki, A. Hara, S. Kamitani, W. Minamide, H. Igarashi, y Y. Hinuma. 1994. The gene encoding a new mitogenic factor in a Streptococcus pyrogenes strain is distributed only in group A streptococci. Infection and Immunity. 62: 4000-4004.

94. Zagursky, R. J. y D. Russell. 2001. Bioinformatics: Use in Bacterial Vaccine Discovery. BioTechniques. 31: 636-659.

La invención estando ahora completamente descrita, será evidente para una persona medianamente versada en la técnica que se pueden hacer muchos cambios y modificaciones a ésta sin salirse del espíritu y alcance de la invención como se estableció aquí. Lo anterior describe las modalidades preferidas de la presente invención junto con un número de posibles alternativas. Estas modalidades, sin embargo, son simplemente de ejemplo y la invención no se limita a ellas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

(a) por lo menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452;

(b) por lo menos una proteína que comprende una secuencia de aminoácido que es codificada por un nucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de los polinucleótidos que codifican cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452;

(c) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b); o

(d) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b) o porción inmunogénica descrita en (c).

2. La composición de la reivindicación 1, en donde la por lo menos una proteína comprende la secuencia de

aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-449.

3. La composición de la reivindicación 1, en donde la por lo menos una proteína comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 450-452.

4. La composición de la reivindicación 1, en donde la por lo menos una proteína codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido se codifica por el nucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido que codifica cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-449.

5. La composición de la reivindicación 1, en donde la por lo menos una proteína codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido se codifica por el nucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido que codifica cualquiera de las ID DE SEC NOS: 450-452.

6. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición adicionalmente comprende por lo menos una

proteína de unión transferrin, Por A, Por B, o proteína de opacidad (Opc).

7. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición adicionalmente comprende por lo menos un antígeno de superficie adicional de *Neisseria species*, dicho antígeno de superficie adicional es una proteína no-ORF2086.

8. La composición de la reivindicación 1, en donde la por lo menos una proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 26,000 a aproximadamente 30,000 según se midió mediante espectrometría de masa.

9. La composición de la reivindicación 1, en donde la por lo menos una proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 28-35 kDa según se midió sobre un gel de poliacrilamida SDS 10%-20%.

10. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición adicionalmente comprende un amortiguador, diluyente, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable.

11. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición adicionalmente comprende un portador.

12. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición adicionalmente comprende un adyuvante.

13. La composición de la reivindicación 12, en donde dicho adyuvante comprende un líquido.

14. La composición de la reivindicación 1, en donde la proteína es no lipidada.

15. La composición de la reivindicación 1, en donde la proteína es una proteína recombinante.

16. La composición de la reivindicación 1, en donde la proteína es aislada de *Neisseria species* nativa.

17. La composición de la reivindicación 1, en donde la proteína es una lipoproteína.

18. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición adicionalmente comprende un polisacárido.

19. La composición de la reivindicación 60, en donde dicha composición comprende un péptido, polipéptido o proteína adicional, dicha composición forma un conjugado que induce una respuesta inmune a dos o más bacterias en un mamífero.

20. Una composición que comprende:

(a) por lo menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares;

(b) por lo menos una proteína codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares;

(c) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b); o

(d) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b) o fragmento inmunogénico descrito en (c).

21. La composición de la reivindicación 20, en donde la por lo menos una proteína comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 433-443 numeradas impares.

23. La composición de la reivindicación 20, en donde la por lo menos una proteína comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-431 numeradas impares.

24. La composición de la reivindicación 20, en donde la por lo menos una proteína codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido se codifica por el nucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de las ID DE SEC NOS: 432-442 numeradas pares.

25. La composición de la reivindicación 20, en donde la por lo menos una proteína codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido se codifica por el nucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-430 numeradas pares.

26. La composición de la reivindicación 20, en donde la composición adicionalmente comprende por lo menos una proteína de unión transferrin, Por A, Por B, o proteína de opacidad (Opc).

27. La composición de la reivindicación 20, en donde la composición adicionalmente comprende por lo menos un antígeno de superficie adicional de *Neisseria species*, dicho antígeno de superficie adicional es una proteína no-ORF2086.

28. La composición de la reivindicación 20, en donde la por lo menos una proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 26,000 a aproximadamente 30,000 según se midió mediante espectrometría de masa.

29. La composición de la reivindicación 20, en donde la por lo menos una proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 28-35 kDa según se midió sobre un gel de poliacrilamida SDS 10%-20%.

30. Una composición que comprende:

por lo menos un antígeno de una primera cepa bacterial de *Neisseria species* que suministra inmunogenicidad contra infección de un sujeto mediante una segunda cepa bacterial de *Neisseria species;*

en donde la primera cepa es la cepa M98 250716 del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* y dicha segunda cepa es otra cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

31. Una composición que comprende:

por lo menos un antígeno de una primera cepa bacterial de *Neisseria species* que suministra inmunogenicidad contra infección de un sujeto mediante una segunda cepa bacterial de *Neisseria species;*

en donde la primera cepa es cualquiera de las cepas seleccionadas del grupo que consiste de CDC-5315, B40, M97 250571, CDC-2367, CDC-1343, CDC-983 y CDC-852 del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* y dicha segunda cepa es otra cepa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

32. Una composición que comprende:

por lo menos una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO: 301;

en donde x es cualquier aminoácido;

en donde la región desde la posición de aminoácido 5 a la posición de aminoácido 8 es cualquiera de 0 a 4 aminoácidos;

en donde la región desde la posición de aminoácido 66 a la posición de aminoácido 68 es cualquiera de 0 a 3 aminoácidos; y

en donde la por lo menos una proteína aislada además comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-449.

33. La composición de la reivindicación 32, en donde la región desde la posición de aminoácido 5 a la posición de aminoácido 8 comprende 0 o 4 aminoácidos.

34. La composición de la reivindicación 32, en donde la región desde la posición de aminoácido 66 a la posición de aminoácido 68 comprende 0 o 3 aminoácidos.

35. Una composición que comprende: por lo menos una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO: 302;

en donde x es cualquier aminoácido;

en donde la región desde la posición de aminoácido 8 a la posición de aminoácido 12 es cualquiera de 0 a 5 aminoácidos y

en donde la por lo menos una proteína aislada además comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 450-452.

36. La composición de la reivindicación 35, en donde la región desde la posición de aminoácido 8 a la posición de aminoácido 12 comprende 0 o 5 aminoácidos.

37. Una composición que comprende: por lo menos un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente con cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452;

(b) por lo menos una proteína que comprende una secuencia de aminoácido que es codificada por un nucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de los polinucleótidos que codifican cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452; o

(c) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b); o

(d) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b) o una porción inmunogénica descrita en (c).

38. La composición de la reivindicación 37, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

39. La composición de la reivindicación 37, que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

40. Una composición que comprende: por lo menos un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente con cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína que comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331 a 443 numeradas impares; o

(b) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a); o

(c) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o un fragmento inmunogénico descrito en (b).

41. La composición de la reivindicación 40, en donde la por lo menos una proteína, porción inmunogénica de ésta o equivalente biológico de ésta comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452.

42. La composición de la reivindicación 40, en donde el por lo menos un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

43. Una composición que comprende:

por lo menos un polinucleótido que (a) codifica por lo menos una proteína aislada que comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452, o (b) hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de los polinucleótidos descrito en (a).

44. La composición de la reivindicación 43, que comprende adicionalmente una secuencia líder P4 (ID DE SEC NO: 322).

45. La composición de la reivindicación 43, en donde dicha composición comprende un vector.

46. La composición de la reivindicación 43, en donde las condiciones de restricción son condiciones de hibridización southern de restricción alta.

47. La composición de la reivindicación 43, en donde el polinucleótido es un polinucleótido recombinante.

401

48. La composición de la reivindicación 43, en donde el polinucleótido es aislado desde una fuente natural.

49. La composición de la reivindicación 43, en donde dicha composición adicionalmente comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína, polipéptido o péptido adicional.

50. Una composición que comprende: un vector que comprende cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452; o

(b) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a); o

(c) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o fragmento inmunogénico descrito en (b).

51. La composición de la reivindicación 50, en donde el vector es un plásmido.

52. La composición de la reivindicación 50, en donde el vector es un fago.

53. La composición de la reivindicación 50, en donde el vector es un bacteriófago.

54. La composición de la reivindicación 50, en donde el vector es un fago moderado.

55. Una composición que comprende:

un vector que comprende por lo menos un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO: 300;

en donde x es cualquier aminoácido;

en donde la región desde la posición de aminoácido 5 a la posición de aminoácido 9 es cualquiera de 0 a 5 aminoácidos;

en donde la región desde la posición de aminoácido 67 a la posición de aminoácido 69 es cualquiera de 0 a 3 aminoácidos;

en donde la posición de aminoácido 156 es cualquiera de 0 a 1 aminoácido;

y en donde la proteína además comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-449.

56. Una composición que comprende: un vector que comprende cualquiera de:

(a) por lo menos un polinucleótido que codifica por lo menos uno de los polipéptidos de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares; o

(b) por lo menos un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a por lo menos un polinucleótido de (a).

57. La composición de la reivindicación 56, en donde el vector comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares.

58. Una composición que comprende: una célula huésped transformada/transfectada o infectada con un vector, dicho vector que comprende cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína codificada por un marco de lectura abierto de *Neisseria species* (ORF2086), dicho marco de lectura abierto que codifica un antígeno inmunogénico reactivo cruzado, y dicho antígeno inmunogénico reactivo cruzado que suministra inmunogenicidad contra infección mediante el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* en un sujeto; o

(b) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a); o

(c) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o fragmento inmunogénico descrito en (b).

59. Una composición que comprende: una célula huésped transformada/transfectada o infectada con un vector, dicho vector que comprende cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína que comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452; o

(b) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a); o

(c) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o porción inmunogénica descrita en (b).

60. Una composición preparada mediante un proceso que comprende: aislar y purificar de *Neisseria species* cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína codificada por un marco de lectura abierto de *Neisseria species* (ORF2086), dicho marco de lectura abierto que codifica un antígeno inmunogénico reactivo cruzado, y dicho antígeno inmunogénico reactivo cruzado que suministra inmunogenicidad contra infección por el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* en un sujeto; o

(b) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a); o

(c) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o fragmento inmunogénico descrito en (b); y en donde el por lo menos un polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares.

61. La composición de la reivindicación 60, en donde el proceso además comprende introducir una secuencia líder no nativa al por lo menos un polinucleótido aislado.

62. La composición de la reivindicación 61, en donde la secuencia líder no nativa es secuencia líder P4 (ID DE SEC NO: 322).

63. Una composición preparada mediante un proceso que comprende: aislar y purificar de *Neisseria species* cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína que comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452; o

(b) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a); o

(c) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o porción inmunogénica descrita en (b).

64. Una composición preparada mediante un proceso que comprende: aislar y purificar de *Neisseria species* cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares;

(b) por lo menos una proteína codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares;

(c) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b); o

(d) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b) o fragmento inmunogénico descrito en (c).

65. Una composición que comprende:

por lo menos un antígeno de *Neisseria meningitidis* específico de no-cepa inmunogénico, dicho antígeno es no patogénico y sustancialmente libre de cualquier impureza infecciosa;

en donde el antígeno comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos identidad de secuencia de aminoácido aproximadamente 70% con cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares.

66. Uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-65 en la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un mamífero.

67. El uso de acuerdo con la reivindicación 66, en donde dicha composición se administra parenteralmente.

68. El uso de acuerdo con la reivindicación 66, en donde dicha composición se administra mucosalmente.

69. El uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-65 en un medicamento efectivo contra meningitis bacterial en un mamífero.

70. El uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 69, en donde dicha composición se administra parenteralmente.

71. El uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 69, en donde dicha composición se administra mucosalmente.

72. El uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 69, en donde la composición se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

73. Un método para preparar una composición que comprende: expresar en una célula huésped una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína codificada por un marco de lectura abierto de *Neisseria species* (ORF2086), dicho marco de lectura abierto que codifica un antígeno inmunogénico reactivo cruzado, y dicho antígeno inmunogénico reactivo cruzado que suministra inmunogenicidad contra infección por serogrupo B de *Neisseria meningitidis* en un sujeto; o

(b) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a); o

(c) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o fragmento inmunogénico descrito en (b);

y en donde la por lo menos una proteína comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452.

74. El método de la reivindicación 73, en donde la secuencia de ácido nucleico se expresa *in vivo*.

75. El método de la reivindicación 73, en donde la secuencia de ácido nucleico se expresa *in vitro*.

76. El método de la reivindicación 73, que comprende además asociar una secuencia líder P4 (ID DE SEC NO: 322).

77. Un método para preparar una composición que comprende:

aislar y purificar de *N. meningitidis* por lo menos un polinucleótido que (a) codifica por lo menos una proteína codificada por un marco de lectura abierto de *Neisseria species* (ORF2086) o por lo menos una porción inmunogénica o equivalente biológico de dicha por lo menos una proteína, dicho marco de lectura abierto que codifica un antígeno inmunogénico reactivo cruzado, y dicho antígeno inmunogénico reactivo cruzado que suministra inmunogenicidad contra infección por serogrupo B de *Neisseria meningitidis* en un sujeto; o (b) hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de los polinucleótidos descritos en (a).

78. El método de la reivindicación 77, en donde las condiciones de restricción son condiciones de hibridización southern de restricción alta.

79. Un método para preparar una composición que comprende: aislar y purificar de *Neisseria species* cualquiera de la proteínas, porciones inmunogénicas o equivalentes biológicos descritos aquí.

80. Un método para preparar una composición de anticuerpo que comprende: recuperar anticuerpos de un animal después de introducir en el animal una composición que comprende cualquiera de la proteínas, porciones inmunogénicas o equivalentes biológicos descritos aquí.

81. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero que comprende: administrar al mamífero una cantidad efectiva de una o más de las composiciones de las reivindicaciones 1-65.

82. El método de la reivindicación 81, en donde dicha composición se administra parenteralmente.

83. El método de la reivindicación 81, en donde dicha composición se administra mucosalmente.

84. Un método para prevenir o tratar meningitis bacterial en un mamífero que comprende: administrar al mamífero

una cantidad efectiva de una o más de las composiciones de las reivindicaciones 1-65.

85. El método de la reivindicación 84, en donde dicha composición se administra parenteralmente.

86. El método de la reivindicación 84, en donde dicha composición se administra mucosalmente.

87. El método de la reivindicación 84, en donde la composición se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

88. Un método para prevenir o tratar meningitis bacterial en un mamífero que comprende:

administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición de anticuerpo que comprende anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente con una proteína, porción inmunogénica o equivalente biológico que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares o cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452.

89. El método de la reivindicación 88, en donde la composición de anticuerpo se administra parenteralmente.

90. El método de la reivindicación 88, en donde la composición de anticuerpo se administra mucosalmente.

91. El método de la reivindicación 88, en donde la composición de anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

92. Un método para preparar una composición que comprende: expresar en una célula huésped una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de:

(a) por lo menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares o cualquiera de las ID DE SEC NOS: 254-299;

(b) por lo menos una proteína codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de

cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares;

(c) por lo menos una porción inmunogénica de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b); o

(d) por lo menos un equivalente biológico de por lo menos una proteína descrita en (a) o (b) o fragmento inmunogénico descrito en (c).

93. El método de la reivindicación 92, en donde la secuencia de ácido nucleico se expresa *in vivo*.

94. El método de la reivindicación 92, en donde la secuencia de ácido nucleico se expresa *in vitro*.

95. El método de la reivindicación 92, en donde el vector es un plásmido.

96. El método de la reivindicación 92, en donde el vector es un fago.

97. El método de la reivindicación 92, que comprende además asociar una secuencia líder no nativa con dicho por lo menos un polinucleótido aislado.

98. El método de la reivindicación 97, en donde la secuencia líder no nativa es secuencia líder P4 (ID DE SEC NO: 267).

99. Un método para preparar una composición de anticuerpo que comprende: recuperar anticuerpos de un animal después de introducir en el animal una composición que comprende:

(a) por lo menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares o la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452; o

(b) por lo menos una proteína codificada por un nucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción al polinucleótido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares.

100. El método de la reivindicación 99, en donde las condiciones de restricción son condiciones de hibridización southern de restricción alta.

101. Una línea celular transformada/transfectada o infectada que comprende:

una célula recombinante que expresa una secuencia de ácido nucleico que (a) codifica por lo menos una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 444-452, o (b) hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de los polinucleótidos descritos en (a).

102. Una línea celular transformada/transfectada o infectada que comprende:

una célula recombinante que expresa una secuencia de ácido nucleico que (a) codifica por lo menos una proteína codificada por un marco de lectura abierto de *Neisseria species* (ORF2086) o por lo menos una porción inmunogénica o equivalente biológico de dicha por lo menos una proteína, dicho marco de lectura abierto que codifica un antígeno inmunogénico reactivo cruzado, y dicho antígeno inmunogénico reactivo cruzado que suministra inmunogenicidad contra infección por el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* en un sujeto o (b) hibridiza bajo

condiciones de restricción a cualquiera de los polinucleótidos de (a);

o una célula recombinante que expresa una secuencia de ácido nucleico que codifica: (c) por lo menos un polipéptido codificado por cualquiera de (a) o (b); o (d) por lo menos un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares.

103. La línea celular transformada/transfectada o infectada de la reivindicación 102, en donde el polipéptido es un anticuerpo monoclonal.

104. La línea celular transformada/transfectada o infectada de la reivindicación 102, en donde la célula recombinante es un hibridoma.

105. La línea celular transformada/transfectada o infectada de la reivindicación 102, en donde la célula recombinante es un trioma.

106. Una línea celular transformada/transfectada o infectada que comprende:

una célula recombinante que expresa una secuencia de ácido nucleico que comprende:

(a) por lo menos un polinucleótido que codifica una proteína que comprende cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares;

(b) por lo menos un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 330-442 numeradas pares;

(c) por lo menos un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de restricción a cualquiera de (a) o (b);

o una célula recombinante que expresa una secuencia de ácido nucleico que codifica:

(d) por lo menos un polipéptido codificado por cualquiera de (a), (b) o (c); o

(e) por lo menos un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las ID DE SEC NOS: 331-443 numeradas impares.

107. La línea celular transformada/transfectada o infectada de la reivindicación 106, en donde el polipéptido es un anticuerpo monoclonal.

108. La línea celular transformada/transfectada o infectada de la reivindicación 106, en donde la célula recombinante es un hibridoma.

109. La línea celular transformada/transfectada o infectada de la reivindicación 106, en donde la célula recombinante es un trioma.

110. Una composición como se describió sustancialmente en lo precedente.

111. Un uso sustancialmente como se describió en lo precedente.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SCHULMAN, Robert, M.
Hunton & Williams, LLP
1900 K Street, N.W.
Suite 1200
Washington, DC 20006-1109
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 02 July 2004 (02.07.2004)	
Applicant's or agent's file reference 38523.000090	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2004/011901	International filing date (day/month/year) 16 April 2004 (16.04.2004)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 16 April 2003 (16.04.2003)
Applicant WYETH et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
16 April 2003 (16.04.2003)	60/463,161	US	28 June 2004 (28.06.2004)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.87.20

Authorized officer

Bernard THORAX

Telephone No. (41-22) 338 8213

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
ROBERT M. SCHULMAN
HUNTON & WILLIAMS, LLP
1900 K STREET, N.W.
SUITE 1200
WASHINGTON, DC 20006-1109

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

	Date of mailing (*day/month/year*) 24 JUN 2005
Applicant's or agent's file reference 38523.000090	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below

International application No.	International filing date (*day/month/year*)	Priority date (*day/month/year*)
PCT/US04/11901	16 April 2004 (16.04.2004)	16 April 2003 (16.04.2003)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(7): A61K 39/02, 39/38, 39/095 and US Cl.: 424/190.1, 234.1, 184.1, 250.1

Applicant

WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I — Basis of the opinion
- ☐ Box No. II — Priority
- ☒ Box No. III — Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV — Lack of unity of invention
- ☐ Box No. V — Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI — Certain documents cited
- ☐ Box No. VII — Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII — Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US	Authorized officer
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	S. Devi, Ph.D. *T. Roberts for* Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (January 2004)

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/11901

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

☐ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☐ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in international application as filed.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/11901

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☒ the entire international application

☐ claims Nos. _____

because:

☐ the said international application, or the said claim Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ the claims, or said claims Nos. 1-111 are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard
the computer readable form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details.

PATENT COOPERATION TREATY RMS/SFY/Sarah K

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
ROBERT M. SCHULMAN
HUNTON & WILLIAMS, LLP
1900 K STREET, N.W.
SUITE 1200
WASHINGTON, DC 20006-1109

38523.90

RECEIVED
JUN 27 2005
6660
Hunton & Williams LLP

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 38523.000090	Date of Mailing (day/month/year) 24 JUN 2005 FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US04/11901 Docketed 6/27/05	International filing date (day/month/year) 16 April 2004 (16.04.2004)
Applicant WYETH	

1. ☐ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☒ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

   Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 *bis*.1 and 90 *bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/ US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer S. Devi, Ph.D. S. Devi Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/220 (April 2002) *(See notes on accompanying sheet)*

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT
(PCT Article 17(2)(a), Rule 13*ter*.1(c) and 39)

Applicant's or agent's file reference 38523.000090	IMPORTANT DECLARATION	Date of mailing (day/month/year) 24 JUN 2005
International application No. PCT/US04/11901	International filing date *(day/month/year)* 16 April 2004 (16.04.2004)	(Earliest) Priority date *(day/month/year)* 16 April 2003 (16.04.2003)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC(7): A61K 39/02, 39/38, 39/095 and US Cl.: 424/190.1, 234.1, 184.1, 250.1		
Applicant WYETH		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that no international search report will be established on the international application for the reasons indicated below.

1. ☐ The subject matter of the international application relates to:
   - a. ☐ scientific theories.
   - b. ☐ mathematical theories
   - c. ☐ plant varieties.
   - d. ☐ animal varieties.
   - e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes.
   - f. ☐ schemes, rules or methods of doing business.
   - g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts.
   - h. ☐ schemes, rules or methods of playing games.
   - i. ☐ methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
   - j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy.
   - k. ☐ diagnostic methods practised on the human or animal body.
   - l. ☐ mere presentations of information.
   - m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.

2. ☒ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:
   ☐ the description ☒ the claims ☐ the drawings

3. ☒ The failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions prevents a meaningful search from being carried out:
   - ☒ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
   - ☒ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

4. ☐ The failure of the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions prevents a meaningful search from being carried out:
   - ☐ the written form has not been furnished.
   - ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the technical requirements.

5. Further comments:
Please See Continuation Sheet

Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	S. Devi, Ph.D. *F. Roberts for* Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/203 (January 2004)

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT Form PCT/ISA/203 (January 2004)	International application No. PCT/US04/11901

5. Further comments:

No response to the invitation (Form 225) to furnish a nucleotide and/or amino acid sequence listing in written form and in computer readable form has been received. The corresponding US application doe not contain SEQ ID numbers beyond SEQ ID NO: 329. No meaningful search and examination of this application is possible.

[redacted]

FORMATO DE DIGITALIZACI N
RELACION DE ANEXOS

Royal Technologies S.A.

428

Item		Expediente No 05116231	No de Folio
		No de unidades	√
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA X	1	←
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: Arte Final

429

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 05116231 20060303 Folios: 429
Fecha (AMD): 2005-11-16 17:06:33
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 0429 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DE TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN PCT MODELO DE UTILIDAD	( )	(X)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	( )	(X)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	(X)
- Descripción de la invención.	( )	(X)
- Dibujos de ser estos pertinentes.	( )	(X)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		
COMPLETA (X)	INCOMPLETA ( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta	( )	( )
- la solicitud.		
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )
COMPLETA ( )	INCOMPLETA ( )	( )
ESQUEMA DE TRAZADO ( )		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	( )	( )
Representación gráfica del esquema de trazado	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( )	INCOMPLETA ( )	( )

Firma Responsable:

Fecha:

430

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D'ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	05 116231
	Solicitud internacional	US2004/011901
	Fecha inicio fase nacional	16/11/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	1469

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 10 FEB. 2006
adpal

P-203